

BLACK STAIN
Epidemiologische Untersuchung und quantitativer
Nachweis kario- und parodontopathogener Keime
mittels Real-time-PCR

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem
Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Zahnärztin Birgit Bartsch
geboren am 19.04.1965 in Grevenbroich

Gutachter

1. Prof. Dr. Roswitha Heinrich-Weltzien, Jena
2. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena
3. Prof. Dr. Christian Hirsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02.2011

Gewidmet

in Dankbarkeit meiner lieben Mutter Rosemarie Bartsch, geb. Fleger
und in Erinnerung an meinen lieben verstorbenen Vater Günther Bartsch

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-Ab	Actinomyces antibody
<i>A.a./A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildung
<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
a-PRP	saures prolinreiches Protein
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
<i>B. melaninogenicus</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>
bzw.	beziehungsweise
CFU (KbE)	Colony Forming Units (koloniebildende Einheiten)
D1/d1	Kariesläsion bis in die äußere Schmelzhälfte
D2/d2	Kariesläsion bis in die innere Schmelzhälfte
D3/d3	Kariesläsion bis in die äußere Dentinhälfte
D4/d4	Kariesläsion bis in die innere Dentinhälfte
dsDNA	doppelstrangige DNA
DMFT/dmft	Summe der zerstörten (decayed), fehlenden (missing) und gefüllten (filled) Zähne (teeth)
DNA (DNS)	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDX/SEM	Energy dispersive X-ray spectroscopy/scanning electron microscope (energiedispersive Röntgenspektroskopie/Rasterelektronenmikroskop)
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
J.	Jahre
KZ	Keimzahl
LA-ICP-MS	Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (Massenspektroskopie mit Laser-Ablation und induktiv gekoppelter Plasmaanregung)
min	Minute
n	Anzahl
NaOCl	Natriumhypochlorit
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. melaninogenicus</i>	<i>Prevotella melaninogenicus</i>
ppm	parts per million
RNA (RNS)	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

SD	Standardabweichung
SGB	Sozialgesetzbuch
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Statistiksoftware)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
ssp.	subspecies
Taq-DNA-Polymerase	<i>Thermus-aquaticus</i> -DNA-Polymerase
U/min	Umdrehung pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 ZUSAMMENFASSUNG	5
2 EINLEITUNG	7
2.1 Intrinsische und extrinsische Zahnverfärbungen	7
2.2 Zur Epidemiologie von black stain	11
2.2.1 Definition, Prävalenz und Ätiologie von black stain und Beziehung zum Kariesbefall	11
2.2.2 Beziehung zwischen Kariesbefall und black stain zum Migrationshintergrund	16
2.3 Mikrobiologie der kario- und parodontopathogenen Mundflora	18
2.3.1 Plaque/Zahnstein	18
2.3.2 Kario- und parodontopathogene Mikroorganismen	19
2.3.3 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR)	25
2.3.4 Prinzip der Real-time-PCR	26
3 ZIELE DER ARBEIT	27
4 MATERIAL UND METHODE	28
4.1 Epidemiologische Untersuchung zu black stain	28
4.1.1 Probandengut	28
4.1.2 Klinische Untersuchung und schriftliche Befragung der Eltern	28
4.2 Mikrobiologische Untersuchung von Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben	30
4.2.1 Probandengut, Entnahme und Lagerung des Probenmaterials	30
4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungsmethode mittels DNA-Isolation und Real-time-PCR	31
4.3 Statistische Auswertung	34
5 ERGEBNISSE	35
5.1 Epidemiologische Ergebnisse	35
5.1.1 Prävalenz und geschlechtsbezogene Verteilung von black stain	35
5.1.2 Vorkommen von black stain in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall	35
5.1.3 Vorkommen von black stain in Beziehung zum Migrationshintergrund und zum Migrationsgrad	36
5.1.4 Migrationshintergrund in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall	37
5.1.5 Beziehung zwischen dem Vorkommen von black stain, Kariesbefall und Migrationshintergrund	39

5.2	Qualitative und quantitative mikrobiologische Befunde von Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben	40
5.2.1	Gesamtkeimzahl	41
5.2.2	Spezies mit signifikanten oder tendenziell signifikanten Unterschieden zwischen Plaqueproben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe	42
5.2.3	Spezies ohne signifikante Unterschiede zwischen Plaqueproben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe	47
6	DISKUSSION	49
6.1	Diskussion der epidemiologischen Ergebnisse	49
6.1.1	Prävalenz von black stain	49
6.1.2	Geschlechtsbezogene Verteilung von black stain	50
6.1.3	Vorkommen von black stain in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall	51
6.1.4	Vorkommen von black stain in Beziehung zum Migrationshintergrund	52
6.1.5	Migrationshintergrund in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall	52
6.1.6	Beziehung zwischen dem Vorkommen von black stain, Kariesbefall und Migrationshintergrund	54
6.2	Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse	55
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	59
8	LITERATURVERZEICHNIS	60
9	ANHANG	76
9.1	Fragebogen zur Erfassung des Migrationshintergrundes und zum Vorliegen von Allgemeinerkrankungen und einer Medikation bei den Probanden	76
9.2	Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung	77
9.3	Vorträge und Veröffentlichungen	80
9.4	Danksagung	81
9.5	Lebenslauf	82
9.6	Ehrenwörtliche Erklärung	84

1 ZUSAMMENFASSUNG

Black stain ist definiert als eine vorwiegend bei Kindern auftretende dunkel pigmentierte, fest am Zahnschmelz haftende exogene Substanz, die als Punkte oder schmale Linie, im unteren Drittel der Zahnkrone girlandenförmig, parallel zum Gingivarand verläuft. In der Literatur wird black stain mit einer niedrigen Kariesprävalenz und -erfahrung assoziiert. Die Häufigkeit des Vorkommens wird je nach Alter der Untersuchungspopulation und -region zwischen 1 und 23 % angegeben. Die Ätiologie von black stain ist bislang nicht geklärt. Die Vermutungen zur Entstehung reichen über bakterielle und mykologische bis hin zu ernährungsbedingten und biochemischen Ansätzen.

Ziele: Das Ziel des epidemiologischen Teils der vorliegenden Arbeit war es, im Rhein-Kreis Neuss (NRW, Deutschland) bei Kindergarten- und Grundschulkindern im Alter von 2-10 Jahren die Black-stain-Prävalenz in Beziehung zur Kariesprävalenz und -erfahrung sowie zum Migrationshintergrund zu erfassen. Folgende Hypothesen sollten überprüft werden: Hypothese 1: Black stain hat eine kariesprotektive Wirkung. Hypothese 2: Das Vorkommen von black stain ist positiv assoziiert mit einem Migrationshintergrund der Kinder. Das Ziel des mikrobiologischen Teils der Untersuchung war es, kario- und parodontopathogene Keime in Black-stain-Proben und in nichtkolorierten Plaqueproben mittels Real-time-PCR zu bestimmen, um folgende Hypothesen zu überprüfen: Hypothese 3: Die bakterielle Zusammensetzung von black stain unterscheidet sich von der normalen nichtkolorierten Plaque. Hypothese 4: Die spezielle bakterielle Zusammensetzung von black stain bedingt die niedrige Kariesprävalenz und -erfahrung der Black-stain-Träger.

Material und Methode: Epidemiologisch wurden 7624 Kinder im Alter von 2-10 Jahren im Rhein-Kreis Neuss im Rahmen der zahnärztlichen Reihenuntersuchung nach SGB 5 § 21 untersucht. Aus diesem Probandengut wurden 113 Kinder mit Black-stain-Befall ermittelt und zur Black-stain-Gruppe zusammengefasst. 339 Kinder (3x113) ohne jegliche Zahnverfärbungen bildeten die Kontrollgruppe. Von beiden Gruppen wurde der Kariesbefall nach WHO-Standard (1997) ermittelt und eine schriftliche Befragung der Eltern zum Migrationshintergrund durchgeführt. Für die mikrobiologische Untersuchung wurden nach Zustimmung der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena (Bearbeitungsnummer 1921-12/06), schriftlicher Information und Einverständniserklärung der Eltern 46 Black-stain-Proben (Black-stain-Gruppe) und 47 nichtkolorierte Plaqueproben (Kontrollgruppe) von Schülern im Alter von 6-10 Jahren entnommen. Mittels Real-time-PCR wurden in den Proben die Gesamtkeimzahl sowie die Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. mutans* und *S. sobrinus* quantitativ bestimmt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 15.0. Als Schwellenwert für die Signifikanz wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen: Im Rhein-Kreis Neuss lag bei den 2- bis 10-Jährigen eine Black-stain-Prävalenz von 1,5 % vor. Die Black-stain-Gruppe wies eine signifikant niedrigere Kariesprävalenz und -erfahrung sowie dt- und mt-Komponenten im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Demzufolge konnte Hypothese 1 bestätigt werden. Weiterhin hatten Kinder mit Migrationshintergrund signifikant häufiger black stain als Kinder deutscher Herkunft, wodurch Hypothese 2 dieser Arbeit bestätigt wird. Black stain hat bei Kindern mit und ohne Migrationshintergrund zwar eine kariesprotektive Wirkung, kann eine zahngesundheitliche Ungleichheit, bedingt durch sozioökonomisches Verhalten, jedoch nicht ausgleichen. Mikrobiologisch wurden in der Black-stain-Gruppe, bei gleicher Gesamtkeimzahl, signifikant höhere Keimzahlen von *A. naeslundii* und *P. gingivalis* sowie signifikant niedrigere Keimzahlen von *F. nucleatum* und *Laktobazillen* und tendenziell niedrigere Keimzahlen von *S. mutans* im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Für alle weiteren analysierten Spezies (*A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *P. intermedia*, *S. sobrinus*) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Es wurde damit eine Verschiebung des bakteriellen Spektrums in der Black-stain-Gruppe beobachtet und Hypothese 3 bestätigt. Die spezielle bakterielle Zusammensetzung von black stain, mit erhöhter Keimzahl von *A. naeslundii* und vermindertem Keimvorkommen von *S. mutans* und *Laktobazillen* dürfte für die niedrige Kariesprävalenz und -erfahrung verantwortlich sein und bestätigt somit Hypothese 4. Die Bindung des in der Black-stain-Gruppe vermehrt auftretenden Keimes *A. naeslundii* als Pionierkeim am oralen Biofilm ist abhängig vom Vorkommen und von der Art eines sauren prolinreichen Proteins (aPRP). Die genetische allele nicht-Db-s-Variante des aPRP korreliert mit hoher *A. naeslundii*- und geringer *S. mutans*-Adhäsion und damit mit einer niedrigeren Karieserfahrung. Genetische Faktoren scheinen hier eine Rolle bei der Ansiedlung bestimmter Keime und damit bei der Entstehung von Karies zu spielen. Weitere genetische Untersuchungen des Speichelproteins aPRP und seiner Variante Db-s könnten Aufschluss über die Verschiebung des bakteriellen Spektrums mit kariesprotektiver Wirkung bei Kindern mit black stain geben. Die erhöhte Keimzahl des parodontopathogenen Keimes *P. gingivalis* und das tendenziell vermehrte Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* lassen Longitudinalstudien sinnvoll erscheinen, die klären, ob die bakterielle Zusammensetzung von black stain im späteren Verlauf mit einer erhöhten Gefahr für parodontale Erkrankungen einhergehen könnte.

2 EINLEITUNG

2.1 Intrinsische und extrinsische Zahnverfärbungen

Zahnverfärbungen können sowohl ein klinisches als auch ein ästhetisches Problem darstellen. Sie unterscheiden sich in der Ätiologie, im Aussehen, in der Entstehung, Zusammensetzung, Lokalisation, Härte und der Festigkeit der Anhaftung am Zahn. Grundsätzlich werden zwei Typen von Zahnverfärbungen unterschieden: intrinsische (interne) und extrinsische (externe) Verfärbungen (Hattab et al. 1999).

Intrinsische Verfärbungen werden durch die Anwesenheit chromogener Substanzen innerhalb des Dentins bzw. des Schmelzes verursacht. Sie können sowohl prä- als auch posteruptiv entstehen und verschiedensten Ursprung haben. Farbveränderungen intrinsischen Ursprungs können durch mechanische Reinigung nicht entfernt werden, da sich das Chromogen innerhalb des Zahnes manifestiert. Tabelle 1 zeigt eine nicht abschließende Übersicht der Ursachen bzw. Erkrankungen und die daraus resultierenden prä- und posteruptiven Zahnverfärbungen.

Extrinsische Zahnverfärbungen entstehen durch die Bindung verschiedenster Chromogene an bereits vorhandene Hartsubstanzauflagerungen wie Pellikel, Plaque und Zahnstein (Dayan et al. 1983). Zur Bindung der Chromogene sind unterschiedliche Anziehungskräfte wie elektrostatische Anziehungen, van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen nötig. Welche Moleküle sich über welche Mechanismen binden, ist bisher weitestgehend unbekannt (Joiner et al. 2003, 2004, Vitkov et al. 2004, Addy und Moran 1995). Externe Zahnverfärbungen können, im Gegensatz zu intrinsischen Verfärbungen, durch professionelle Zahnreinigung unter Anwendung von Reinigungs- und Polierpasten entfernt werden (Kielbassa und Wrbas 2000).

Eine besondere Form der extrinsischen Verfärbungen sind die „internalised discolourations“ (eingelagerten/eingeschlossenen Verfärbungen). Hierbei handelt es sich um externe Chromogene, die in Schmelzdefekte oder poröse Oberflächen wie entwicklungsbedingte Zahnoberflächendefekte, kariöse Läsionen, gingivale Rezessionen und restaurative Materialien eingelagert werden (Watts und Addy 2001).

Nach der bisherigen Nomenklatur wurden die extrinsischen Verfärbungen in metallische und nichtmetallische Verfärbungen unterteilt. Tabelle 2 zeigt eine nicht abschließende Übersicht über Ursachen und daraus resultierende extrinsische Verfärbungen.

Tabelle 1: Ursachen/Erkrankungen und daraus resultierende prä- und posteruptive intrinsische Farbveränderungen (nicht abschließend)

Ursache/Erkrankung	Farbveränderung
Präeruptiv	
Fluorose (Bailey und Christen 1968)	weißlich-opak bis gelb/braun
Turner Zähne (Kamann und Gängler 1999)	weißlich-opak bis gelb-braun/hypoplastische Defekte und Veränderung der Kronenform
Tetrazyklinverfärbungen (Mc Evoy 1989, Davies et al. 1985, Rinderer 1967)	gelb-braun bis grau
Erkrankungen genetischen Ursprungs: Dentinogenesis imperfecta Amelogenesis imperfecta Erythropoetische Porphyrie (autosomal rezessiv vererbte Störung der Hämsynthese) (Trohdahl et al. 1972)	rötlich-braun oder blau-grau, glasartig, bernsteinfarben gelblich-braun, weißlich-opak rötlich durch Einlagerung von Porphyrin
Erkrankungen des blutbildenden Systems: Morbus haemolyticus neonatalis (Erythroblastosis foetalis, Blutgruppenunverträglichkeit) (Herrmann 1965)	grünlich-blau bis braun durch Einlagerung von Biliverdin, Bilirubin
Posteruptiv	
Traumabedingte Einblutungen in Dentinkanälchen (Marin 1997)	rosa über braun nach grau-schwarz, je nach Hämoglobinabbau
Internes Granulom (Schröder 1992)	rosa
Obliterationen der koronalen Pulpa	gelb bis braun
Sekundärdentinbildung und Schmelzreduktion mit zunehmendem Alter	gelb
Unvollständige Pulpaentfernung (iatrogen)	grau-schwarz
Dentale Materialien, z.B. Silberstifte MTA Amalgam	schwarz grau-schwarz grau-schwarz

Tabelle 2: Ursachen und daraus resultierende extrinsische Farbveränderungen (Kielbassa und Wrbas 2000)

Ursache	Farbveränderung
Metallische Verfärbungen	
Cadmium (Cd) (berufliche Exposition)	gelblich bis gold
Eisen (Fe) (Medikamente, Blutbestandteile)	grau bis schwarz
Kalium (K) (Desinfektion, K-Permanganat)	violett bis schwarz
Kupfer (Cu), Messing, Bronze (berufliche Exposition, Spüllösung)	grün bis blau-grün
Nickel (Ni) (berufliche Exposition)	grün
Silber (Ag) (Desinfektionslösung/Silbernitrat)	grau-braun, grau-schwarz, braun-schwarz
Zinn (Sn) (Spüllösung, Zahnpasta, Zinnfluorid)	goldbraun
Nichtmetallische Verfärbungen	
Nahrungs- und Genussmittel <ul style="list-style-type: none"> • Kaffee, Tee • Rotwein • Curry • Beerensorten • Tabak 	braun bis schwarz braun gelb-braun rot, blau, schwarz braun, schwarz
Chromogene Bakterien <ul style="list-style-type: none"> • Flavobacterium lutescens, Serratia marcescens (Carranza et al. 1996, Brook et al. 2007) • Penicillium- und Aspergillus-Spezies (Bartels 1939) • Actinomyces (Slots 1974) 	orange grün schwarz
Internalised discolourations (Watts und Addy 2001)	
Chromogene Einlagerungen in: <ul style="list-style-type: none"> • entwicklungsbedingten Zahnoberflächendefekten • kariösen Läsionen • gingivalen Rezessionen • an restaurativen Materialien 	verschiedene Färbungen

Die bisherige Nomenklatur beschreibt jedoch nicht den Mechanismus der Entstehung der Verfärbung. Zudem wird bei der bisherigen Einteilung der Farbveränderungen das häufig multifunktionell bedingte Geschehen nicht berücksichtigt. Daher wurde von *Nathoo* (1997) eine neue Klassifikation vorgeschlagen. *Nathoo* (1997) unterteilt die extrinsischen Verfärbungen in Typ N1-N3. Bei der Verfärbung vom N1-Typ bindet das gefärbte Material (Chromogen) an die Oberfläche der Zahnhartsubstanz bzw. die Pellikel. Hierbei ist die Farbe des Chromogens gleich der zu beobachtenden Verfärbung. Beim N2-Typ bindet ein farbiges Chromogen an die Zahnoberfläche und ändert nach der Bindung seine Farbe. Der N3-Typ beschreibt die Bindung eines farblosen Materials, das sich durch chemische Reaktion in ein

farbiges Chromogen verwandelt. Ähnlich der Reaktion, die bei angeschnittenen Äpfeln oder Kartoffeln zur Bräunung führt (nichtenzymatische Bräunungsreaktion nach Maillard), können auch in Zahnbelägen Reaktionen zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren ablaufen und zu einem Farbumschlag führen (Nathoo 1997, Adrian 1974). Tabelle 3 zeigt die Klassifikation extrinsischer Verfärbungen und Beispiele für die jeweiligen Typen N1 bis N3 nach Nathoo (1997).

Tabelle 3: Klassifikation extrinsischer Zahnverfärbungen nach Nathoo (1997)

Klassifikation	Definition	Beispiele
N1-Typ	Die Farbe des bindenden Chromogens entspricht der Verfärbung.	Metalle wie Kupfer, Nickel, Eisen (Faunce 1983)
N2-Typ	Das Chromogen ändert nach der Bindung an der Oberfläche seine Farbe.	Tanine aus Kaffee und Tee: zunehmende Farbveränderung von Gelb nach Braun durch Kalzium- oder Magnesiumbrücken Stabilisierung (Kielbassa und Wrbas 2000)
N3-Typ	Farblose Substanz oder ein farbloses Prächromogen wandelt sich nach Bindung durch chemische Reaktion in ein farbiges Chromogen.	Chlorhexidin: Furfurylaldehyde verfärben sich bei Einwirkung von Licht und Sauerstoff bräunlich (Nordbö et al. 1977) Zinnfluorid (Ellingsen et al. 1982)

Eine besondere Art der extrinsischen Verfärbungen stellen die vorwiegend bei Kindern im Bereich des Gingivalsaumes zu beobachtenden orangefarbenen, grünen und schwarzen (black stain) Beläge dar (Vogel 1975).

Die **orangefarbenen Beläge** (orange stain) weisen eine ähnliche Lokalisation und weiche Konsistenz wie Plaque auf und sind ebenso leicht wie diese zu entfernen. Mögliche Ursache der Färbung ist eine Interaktion der natürlichen Plaque mit Nahrungsmitteln oder Einlagerungen chromogener Bakterien wie *Flavobacterium lutescens* (Brook et al. 2007) oder *Serratia marcescens* (Carranza et al. 1996). Die Prävalenz orangefarbener Beläge ist mit 3 % sehr gering und häufig mit einer unzureichenden Mundhygiene verbunden (Brook et al. 2007, Woodall et al. 1989).

Die **grünen Beläge** (green stain) können in jedem Alter auftreten, werden aber bevorzugt bei Kindern beobachtet. Die Prävalenz wird zwischen 3 % (Commerell 1955) und 5,6 % (Gülzow 1963) angegeben. Die Färbung variiert von hellem Grün bis zu schmutzig-dunklem Olivgrün. Der Belag ist flächenhaft, diffus, ohne scharfe Begrenzung meist über die Labialfläche besonders der oberen Frontzähne verteilt. Er kommt vorwiegend in Gebissen mit

schlechter Mundhygiene kombiniert mit gingivalen Entzündungen und hohem Kariesbefall vor (Gülzow 1965, Gülzow 1963, Commerell 1955, Shay 1955, Pedersen 1946, Ayers 1939). Als mögliche Ursache für die grüne Verfärbung werden chromogene Bakterien und Pilze wie *Penicillium* und *Aspergillus* diskutiert (Bartels 1939). Diese Arten von Mikroorganismen wachsen nur bei Anwesenheit von Licht, was auch eine Erklärung für die vorwiegende Lokalisation an den Labialflächen der oberen Frontzähne wäre (Hattab 1999).

2.2 Zur Epidemiologie von black stain

2.2.1 Definition, Prävalenz und Ätiologie von black stain und Beziehung zum Kariesbefall

Für den Begriff „**schwarze Beläge**“ werden in der Literatur synonym die Begriffe **black stain**, **brown stain**, **pigmented dental plaque** (Bibby 1931), **mesenteric line** (Pickerill 1923) und **black extrinsic tooth stain** gebraucht.

Black stain wird definiert als eine vorwiegend bei Kindern auftretende, fest am Zahnschmelz haftende, dunkel pigmentierte exogene Substanz, die als Punkte oder schmale Linie, im unteren Drittel der Zahnkrone girlandenförmig, parallel zum Gingivarand verläuft (Heinrich-Weltzien et al. 2009, Koch 1996, Gülzow 1963) (Abbildung 1).



Abbildung 1: Klinische Manifestation von black stain

Der schwarze Belag kann mit normalen Mundhygienemaßnahmen nicht, wohl aber durch eine professionelle Zahnreinigung entfernt werden (Kielbassa and Wrbas 2000). Nach der Entfernung kommt es jedoch innerhalb von 3-8 Wochen zum erneuten Auftreten (Fuess 1955, Gülzow 1963).

Unter dem Black-stain-Belag befindet sich, im Gegensatz zu orangefarbenen oder grünen Belägen, eine intakte Schmelzoberfläche (Fuess 1955). Auch die Gingiva ist im Gegensatz zu den anderen Zahnbelägen entzündungsfrei (Surdacka 1987, Gülzow 1963).

Die Ausprägung von black stain ist sehr unterschiedlich. Sie reicht über punktförmige schwarze Beläge an nur wenigen Zähnen bis zu flächigen Auflagerungen an fast allen Zähnen. Okklusalfächen der Zähne werden meist durch den Kauakt gereinigt. In seltenen Fällen dehnen sich die schwarzen Beläge aber auch bis auf diese aus und befallen dann vor allem die Fissuren.

Black stain tritt vorzugsweise bei Kindern auf, ist gelegentlich aber auch bei Erwachsenen zu sehen (Gülzow 1963). Bei Kindern im Wechselgebissalter sind sowohl Milchzähne als auch bleibende Zähne befallen (Fuess 1955, Surdacka 1987). Häufig verschwindet der schwarze Belag gegen Ende der Pubertät (Commerell 1955).

Differentialdiagnostisch müssen Raucherbeläge von black stain abgegrenzt werden. Beläge durch Tabakkonsum zeigen jedoch eine weniger lokalisierte Verteilung und sind eher von grauer Farbe. Da es sich bei den Black-stain-Patienten meist um Kinder handelt, ist die Diagnose oft eindeutig. Auch Ablagerungen von Farbstoffen aus Nahrungs- und Genussmitteln, wie z.B. Tee- oder Kaffeebeläge, müssen differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Zahnstein, der durch Blutpigmente dunkel gefärbt ist, könnte ebenfalls zu Verwechslungen führen sowie Karies in Fissuren oder Grübchen.

Zum Zusammenhang von black stain und Karies findet man in der Literatur zum Teil sich widersprechende Aussagen (Tabelle 4). Häufig wird black stain jedoch mit einer niedrigen Kariesprävalenz und -erfahrung assoziiert. Ein Vorkommen in desolaten kariösen Gebissen ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Die Prävalenz von black stain wird in der Literatur je nach Alter der Untersuchungspopulation und -region zwischen 1 und 23 % angegeben. Eine Übersicht der verfügbaren Literatur zur Prävalenz und zu der Beziehung von black stain und Kariesbefall wird in Tabelle 4 (nicht abschließend) wiedergegeben.

Tabelle 4: Literaturübersicht (nicht abschließend) zur Prävalenz von black stain und zur Beziehung von Black-stain-Vorkommen und Kariesbefall
(-- = keine Angaben)

Autor Untersuchungs- jahr (Untersuchungsland)	Untersuchte Population (Alter)	Prävalenz von black stain	Aussage zur Beziehung von Black-stain-Vorkommen und Kariesbefall
Pickerrill 1923 (--)	--	--	lokale oder generelle Kariesimmunität bei black stain
Russell und Bunting 1929 (--)	--	--	schnell voranschreitende Karies im Zusammenhang mit black stain
Bibby 1931 (Neuseeland)	100 Patienten mit black stain 100 Patienten ohne black stain (4-40 J.)	--	Patienten mit black stain: mittlerer DMFT/dmft Wert 5,3 Patienten ohne black stain: mittlerer DMFT/dmft Wert 9,04
Pedersen 1946 (--)	2000 Kinder	--	erhöhte Kariesresistenz bei Kindern mit black stain
Shourie 1947 (Indien)	1097 Jungen (13-16 J.)	14,2 %	Jungen ohne black stain: Milchzähne 30,5 % kariös, bleibende Zähne 8,3 % kariös; Jungen mit black stain: Milchzähne 13,4 % kariös, bleibende Zähne 4,5 % kariös; Je stärker die Pigmentation, desto höher die Kariesfreiheit
Gins 1949 (--)	--	--	Anstieg der Kariesfrequenz bei black stain
Leung 1950 (USA)	355 Probanden (4-20 J.)	--	keine Beziehung zwischen black stain und Kariesanfälligkeit Jungen weisen einen höheren Befall von black stain auf als Mädchen
Fuess 1955 (Deutschland)	1677 Probanden (3-20 J.)	23,3 % Jungen 23,6 % Mädchen 23,0 %	Kinder mit black stain haben häufiger kariesfreie Gebisse Korrelation zwischen Stärke des Black-stain-Belags und Kariesfreiheit konnte nicht beobachtet werden
Commerell 1955 (Deutschland)	12890 Kinder (6-15 J.)	11 % Jungen häufiger betroffen	ohne black stain: 50 von 100 Kindern kariesfrei mit black stain: 69 von 100 Kindern kariesfrei
Gülzow 1963 (Schweiz)	2127 Kinder (7-15 J.)	19,9 %	herabgesetzte Kariesfrequenz bei black stain, innerhalb einzelner Altersgruppen generell kein signifikanter Zusammenhang zwischen Kariesfrequenz und black stain
Renz 1973 (Schweiz)	614 Kinder: (5 ½ J.) (6 ½ J.)	7 % 5,4 %	--
Surdacka 1987 (Polen)	3125 Kinder (4-16 J.)	4,45 %	62,1 % der Kinder mit black stain hatten Karies 100 % der Kinder ohne black stain hatten Karies

Fortsetzung Tabelle 4: Literaturübersicht (nicht abschließend) zur Prävalenz von black stain und zur Beziehung von Black-stain-Vorkommen und Kariesbefall (-- = keine Angaben)

Autor Untersuchungs- jahr (Untersuchungsland)	Untersuchte Population (Alter)	Prävalenz von black stain	Aussagen zur Korrelation von black stain und Karies
Schulwitz 1995 (Deutschland)	6231 Kinder (5-12 J.)	1,14 %	--
Koch et al. 1996 (Deutschland)	801 Kinder (6-11 J.)	4 %	--
Koch et al. 2001 (Italien)	1086 Kinder (6-12 J.)	6,3 %	Kinder mit black stain: 76,1 % kariesfreie bleibende Zähne, 41,8 % kariesfrei, $0,49 \pm 1,05$ DMFT, $1,87 \pm 2,47$ dmft Kinder ohne black stain: 37,3 % kariesfreie bleibende Zähne, 30,4 % kariesfrei, $0,97 \pm 1,40$ DMFT, $2,39 \pm 2,62$ dmft
Gasparetto et al. 2003 (Brasilien)	263 Kinder (6-12 J.)	14,8 %	Kinder mit black stain: 33,3 % kariesfrei, $1,46 \pm 1,39$ DMFT Kinder ohne black stain: 27,2 % kariesfrei, $2,42 \pm 2,09$ DMFT
Fuchs 2003 (Deutschland)	849 Kinder	11,2 %	Kinder mit black stain: 32,6 % kariesfrei, 2,72 DMFT Kinder ohne black stain: 63,8 % kariesfrei, 1,32 DMFT Black stain hat keine kariesprotektive Wirkung
Paredes Gallardo und Paredes Cencillo 2005 (Spanien)	1100 Kinder (4-11 J.)	7,54 %	--
Eick et al. 2006 (Philippinen)	30 Kinder (11,7 J)	16 %	niedrigere Kariesprävalenz mit black stain assoziiert
Heinrich-Weltzien et al. 2009 (Philippinen)	1748 Kinder (11,7 \pm 1,1 J.)	16 %	Kinder mit black stain haben signifikant weniger Karies als Kinder ohne black stain Kinder mit black stain: $1,5 \pm 2,1$ DMFT, Kinder ohne black stain: $2,5 \pm 2,5$ DMFT
Leyton et al. 2009 (Chile)	1790 Kinder (13 J.)	1,28 %	Kinder mit black stain zeigen signifikant geringere DMFT/dmft Werte: Kinder mit black stain: 0,8 DMFT, 0,9 dmft, Kinder ohne black stain: 2,6 DMFT, 1,5 dmft Kinder mit black stain zeigen eine höhere Pufferkapazität
Garan et al. 2009 (Türkei)	--	18,5 %	--

Über die Ätiologie von black stain wurden in der Literatur zahlreiche, einander zum Teil widersprechende Theorien geäußert. Bis heute sind die Ursache der schwarzen Beläge und der Mechanismus der biologischen Interaktion zwischen Mikroorganismen und extrinsischer Pigmentation nicht geklärt (Gasparetto 2003). In Tabelle 5 sind die von verschiedenen Autoren vermuteten Ursachen für black stain zusammengestellt.

Tabelle 5: Literaturübersicht (nicht abschließend) über die vermutete Ätiologie von black stain

Literaturnachweis	Mögliche Ätiologie von black stain
Miller 1894	Chromogene Pilze (<i>Bacillus fuscans</i>)
Goadby 1903	Bakterien (<i>B. gingivae pyogenes</i> , <i>B. plexiformis</i> , <i>Mikrokokkus roseus</i>)
Pickerill 1923	Darmbakterien (nicht genauer spezifiziert)
Schmid 1928	Bakterien (nicht genauer spezifiziert) und Kalksalze
Bibby 1931	Gram-positive Stäbchen und Bazillen (Diphtheroide), <i>Leptothrix buccalis</i> , <i>Bazillus buccalis maximus</i> ; Quali-quantitative Speichelzusammensetzung
Schmid 1949	<i>Leptotrichea buccalis</i>
Dreizen et al. 1949	Karbonyl enthaltende Produkte des Kohlenhydratabbaus reagieren mit organischen Elementen aus Schmelz und Dentin zu einem unlöslichen Pigment, das dem Melanin ähnelt
Gins 1949	<i>Bakterium melaninogenicum</i>
Leimgruber 1950	Vermutete Existenz einer im Speichel gelösten inaktiven Vorstufe (Aufbaufaktor) von black stain
Greve 1953	Black stain entsteht aus Oxalaten der Speisen wie Rhabarber, Sauerampfer, Spinat
Fuess 1955	Melaninproduzierender <i>Bacteroides melaninogenicus</i> (kulturelles Verfahren)
Theilade et al. 1973	Elektronenmikroskopische Untersuchung: intermikrobielle Matrix mit vorwiegend gram-positiven Stäbchen, „spezielle Plaque“ neigt zur Verkalkung
Slots 1974	Mikrobielle Verteilung in Black-stain-Proben (kulturelle und biochemische Verfahren): Vorwiegend gram-positive Stäbchen: 67 % katalase-negative <i>Actinomyceten</i> , 15 % katalase-positive <i>Actinomyceten</i> , 8 % <i>Corynebacterium</i> ; 5 % <i>Streptococci</i> (gram-positive Kokken) (Ursache für geringe Kariesfrequenz); 4 % <i>Neisseria</i> (gram-negative Kokken); < 1 % <i>B. melaninogenicus</i> (gram-negative Stäbchen); keine Isolierung von <i>Lactobacilli</i> Zusammenfassung: in black stain ca. 90 % gram-positive Stäbchen, in normaler Plaque 42 % gram-positive Stäbchen; die bakterielle Variabilität ist in Black-stain-Proben viel geringer als in normalen Plaque-Proben; black stain hat eine charakteristische und stabile Mikroflora, die von <i>Actinomyceten</i> dominiert wird und sich von normaler Plaque-Flora unterscheidet.
Reid und Beeley 1976	Erhöhter Ca- und P-Gehalt in black stain
Reid et al. 1976	<i>Bacteroides melaninogenicus</i> ursächlich für die schwarze Pigmentation von black stain
Reid et al. 1977	Verfärbung wird verursacht durch Eisensalz, wahrscheinlich Eisensulfid, das durch eine Reaktion von bakteriellem Hydrogensulfid und Eisen aus dem Speichel gebildet wird.
Theilade und Pang 1987	Gramfärbung: Vorwiegend lange gram-positive filiforme Mikroorganismen und gram-positive Stäbchen Lichtmikroskopie: dem Schmelz aufgelagerte, innere opak-gelbliche Schicht (ähnlich wie Zahnstein) und äußere bakterielle Schicht; Elektronenmikroskopie (SEM): amorphes, kittartiges Material mit dominierenden langen filiformen Mikroorganismen

Fortsetzung Tabelle 5: Literaturübersicht (nicht abschließend) über die vermutete Ätiologie von black stain

Literaturnachweis	Mögliche Ätiologie von black stain
Surdacka, 1989	Quali-quantitative Speichelzusammensetzung: bei black stain signifikant höhere Konzentrationen an Calcium, anorg. Phosphat, Kupfer, Kalium, Natrium und Gesamteiweiß, niedrigere Konzentration an Glucose; keine signifikanten Unterschiede bei Mg, Fe, Zn, Cl
Saba et al. 2006	PCR-Untersuchung: keine Unterschiede des Vorhandenseins von <i>Prevotella melaninogenica</i> (früher <i>Bacteroides melaninogenicus</i>) und <i>P. gingivalis</i> zwischen Black-stain-Gruppe und Kontrollgruppe; vermehrtes Auftreten von <i>Actinomyces ssp.</i> und <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> in der Black-stain-Gruppe
Eick et al. 2006	Real-time-PCR: signifikant weniger <i>F. nucleatum</i> , Tendenziell weniger <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> ; vermehrtes Vorkommen von <i>P. gingivalis</i> und <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Putzer et al. 2009	EDX/SEM Untersuchung: 63.3 wt% C und N, 8.1 wt% Ca, P und K μ-XRF microfluorescence-Untersuchung: keine Anwesenheit von Fe, Zn und Cu, Anwesenheit von C, N, S, K, Ca, Na und Mg LA-ICP-MS-Analyse: Fe-Konzentration geringer 100 ppm Gesamtaussage: Die Menge an Eisen in black stain ist zu gering, um eine dunkle Verfärbung zu verursachen.
Garan et al. 2009	Keine signifikanten Unterschiede zwischen Black-stain-Gruppe und Gruppe ohne black stain in den Speichelparametern Fließrate, pH-Wert, Calcium und Gesamteiweiß
Leyton et al. 2009	Black-stain-Gruppe zeigt im Gegensatz zur Kontrollgruppe mehr <i>S. mutans</i> und weniger <i>Lactobazillen</i> (kulturelles Verfahren), jedoch keine Signifikanz.
Shin et al. 2009	Antibiotische Aktivität von <i>Actinomyces ssp.</i> auf <i>S. mutans</i> , vergleichbar mit Oxacillin

2.2.2 Beziehung zwischen Kariesbefall und black stain zum Migrationshintergrund

Zahlreiche in den Industriestaaten durchgeführte Studien (Tabelle 6) zeigen, dass Kinder mit Migrationshintergrund einen höheren Kariesbefall und einen niedrigeren Sanierungsgrad aufweisen sowie zahnärztliche Leistungen weniger häufig in Anspruch nehmen (Kühnisch et al. 1998) als die einheimische Bevölkerung.

Als Ursache für diese Unterschiede werden verschiedenste Faktoren diskutiert. Soziale und kulturelle Hintergründe, wie Einkommen, Bildung, Verständigungsschwierigkeiten, soziale Normen und gesellschaftliche Isolation können hier eine Rolle spielen (Gift et al. 1994). Aus zahnärztlicher Sicht sollte die Ernährung berücksichtigt werden. Oft wird die ursprünglich gewohnte Nahrung nach dem Kulturschock und als Folge des entsprechenden Warenangebots durch zahnschädigende, kohlenhydratreiche Ernährung ersetzt (Mashkooi 2004). Durch Arbeitslosigkeit, Integrationsprobleme, andere Wertvorstellungen, politische, soziale und wirtschaftliche Veränderungen rückt die Zahngesundheit in den Hintergrund. Nach Pieper (2005) ist der Sozialstatus der Eltern und ihre schulische und berufliche Ausbildung mit

einem präventiven Verhalten verknüpft. Eltern mit hohem sozioökonomischem Status sorgen in der Regel besser für die Zahngesundheit ihrer Kinder als Eltern mit einem niedrigen Status (Pieper 2005, Butler et al. 2007).

Nach den Untersuchungen von *Fuchs* (2003) ist das Vorhandensein von schwarzen Belägen mit der Migrationserfahrung positiv assoziiert. D.h., Kinder mit Migrationshintergrund haben häufiger black stain.

Untersuchungen zum Vergleich der Karieserfahrung von Kindern mit und ohne Black-stain-Befall in Beziehung zum Migrationshintergrund liegen in der bisherigen Literatur nicht vor.

Tabelle 6: Zahngesundheit von Kindern mit Migrationshintergrund im Vergleich zu deutschen Kindern (Migrationsgrad 1: Eltern im Ausland geboren, Kind in Deutschland geboren, Migrationsgrad 2: Eltern und Kind im Ausland geboren)

Literaturangabe	Untersuchte Population	Deutsche Kinder	Kinder mit Migrationshintergrund
Butler et al. 2007	1642 Kinder (6-7,5 Jahre)	2,7 dmft	Türkische Kinder: 4,1 dmft; ehem. Ostblock: 5,1 dmft; sonstige Nationen: 4,0 dmft
Heinrich-Weltzien et al. 2007	Hauptschüler (15 Jahre)	2,7 DMFT	Türkische Herkunft: 3,1 DMFT
van Steenkiste et al. 2004	4094 Kinder (6-7 J.): dmft 4002 Kinder (9-10 J.): DMFT	1,50/0,31 dmft/DMFT	dmft/DMFT: Spätaussiedler: 4,61/0,77; türkische Kinder: 4,02/1,19; ehemals Jugoslawien: 4,05/1,32; italienische Kinder: 2,35/0,64; griechische Kinder: 1,95/0,69; sonstige Nationen: 3,76/0,57
Fuchs 2003	849 Grund- und Hauptschulkinder	1,01 DMFT 71 % kariesfrei	Migrationsgrad 1: 1,82 DMFT, 45 % kariesfrei Migrationsgrad 2: 2,0 DMFT, 29,9 % kariesfrei
Schäfer 2000	Schulneulings-Untersuchung	0,81 dmft 77,5 % kariesfrei	2,77 dmft 43,6 % kariesfrei
Lindner et al. 1999	4331 Kindergarten- und Schulkinder	6-Jährige: 1,6 dmft 53,6 % naturgesund 9-Jährige: 1,8 DMFT 29,3 % naturgesund	6-Jährige russischer Herkunft: 4,5 dmft 9,5 % naturgesund 9-Jährige russischer Herkunft: 1,9 DMFT 9,9 % naturgesund

2.3 Mikrobiologie der kario- und parodontopathogenen Mundflora

2.3.1 Plaque/Zahnstein

Nach *Theilade et al.* (1973), *Slots* (1974) und *Reid et al.* (1977) ist black stain ein spezieller Typ von dentaler Plaque, der durch eine relativ stabile Mikroflora und die Tendenz zur Verkalkung charakterisiert ist.

Die Entstehung der normalen Plaque ist heute weitgehend erforscht. In vivo konnte nachgewiesen werden, dass sich auf der gereinigten Schmelzoberfläche innerhalb von 60 bis 90 Minuten ein Schmelzoberhäutchen (Pellikel) bildet (Sönju und Röllä 1973). Hierbei handelt es sich um eine strukturlose Schicht aus absorbierten Speichelglykoproteinen, die noch frei von Mikroorganismen ist (Vogel 1975). Im Transmissionsmikroskop erscheint die Pellikel als homogene, strukturlose Schicht mit einer je nach Lokalisationsort und Bildungszeit variierenden Dicke von 80 nm bis 2 µm. Die Pellikel schützt orales Gewebe, reduziert die Löslichkeit der Schmelzoberfläche und schützt die Zahnhartsubstanz vor Säuren. Die Einwirkung saurer Lebensmittel führt zum Verlust des Pellikels und dem Gefühl von „stumpfen“ Zähnen. Innerhalb weniger Minuten kommt es jedoch zu einer Pellikelneubildung. Die Pellikel hat allerdings nicht nur schützende Wirkung. Sie enthält Rezeptorproteine für mikrobielle Zellwandbestandteile, ermöglicht die Anhaftung von Bakterien und ist somit Wegbereiter für die orale Biofilmbildung (Sanderink et al. 2004). Innerhalb weniger Stunden etablieren sich auf der Pellikel gram-positive, aerotolerante Pionierkeime, vorwiegend *S. sanguinis*, *S. oralis*, *A. naeslundii* und *Neisseria ssp.*, gefolgt von sog. Nachfolgerkeimen, wie weitere *Streptokokken ssp.* (*S. mutans*, *S. salivarius*, *S. milleri*, *S. mitis*), sowie gram-negative (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*) und gram-positive Stäbchen (*Aktinomyzeten*), anaerobe gram-negative Kokken (*Veillonellen*) und Filamente (Hellwig et al. 1995).

So entsteht auf der Zahnoberfläche ein strukturierter Belag (Plaque), der sich bei mangelnder Mundhygiene nach subgingival ausdehnt und dann zusätzlich Spirochäten aufweist. Die Plaque ist als eine auf Zahnoberflächen haftende, strukturierte Bakterienaggregation, bestehend aus Mikroorganismen (60-70 Volumen%) und organischer Matrix, definiert. Die Matrix enthält als Hauptbestandteil von den Mikroorganismen gebildete extrazelluläre Polysaccharide, aus dem Speichel stammende Glykoproteine, Nahrungsbestandteile, Bestandteile der Sulkusflüssigkeit und Zellreste. Anorganische Komponenten sind Kalzium-, Phosphat- und in kleineren Mengen Magnesium-, Kalium-, Natrium- und Fluorid-Ionen. Der anorganische Anteil ist am Anfang sehr gering, nimmt aber sehr stark zu, wenn durch Mineralisation die Umwandlung der Plaque in Zahnstein stattfindet (Sanderink et al. 2004).

So entsteht ein Gemisch aus anorganischen (75-80 % Masseanteile) und organischen (20-25 % Masseanteile) Bestandteilen. Entsprechend der Verkalkung lässt der Zahnstein eine Schichtung erkennen. Das Erscheinungsbild, die Wachstumsgeschwindigkeit, der Härtegrad und die Haftung können variieren. Zahnstein kann hartnäckig an der Zahnoberfläche haften. Der Grund für dieses feste Attachment ist die Verkalkung des Pellikels am Schmelz unter der bakteriellen Plaque. Auch black stain ist ein sehr fest am Schmelz haftender Belag. Die Ursache hierfür ist bisher jedoch unklar.

Nach *Marsh* und *Martin* (2003) setzt sich die supragingivale Plaque im Zahnhalsbereich wie in Tabelle 7 gezeigt zusammen.

Tabelle 7: Mikrobielle Zusammensetzung bzw. mengenmäßige Anteile der wichtigsten Bakterienarten in supragingivaler Plaque im Zahnhalsbereich (M = Prozentuale Anteile der kultivierbaren Gesamtflora; N = Isolierungshäufigkeit)

Bakterienspezies	M(%)	N(%)
gram-positive, fakultativ anaerobe Kugelbakterien (v.a. <i>Streptococcus</i>)	40	100
gram-positive, obligat anaerobe Kugelbakterien (v.a. <i>Peptostreptococcus</i>)	1	14
gram-positive, fakultativ anaerobe Stäbchen (v.a. <i>Actinomyces</i>)	35	100
gram-positive, anaerobe Stäbchen (darunter <i>Lactobacillus</i>)	10	86
gram-negativ, fakultativ anaerobe Kugelbakterien (v.a. <i>Neisseria</i>)	<1	14
gram-negativ, obligat anaerobe Kugelbakterien (v.a. <i>Veillonella</i>)	2	24
gram-negativ, obligat anaerobe Stäbchen (darunter Fusobakterien)	13	100

Die mikrobielle Zusammensetzung der subgingivalen Flora weicht von der supragingivalen Plaque ab. Sie besteht aus 25 % Streptokokken, 25 % Aktinomyzeten, 25 % gram-negativen Stäbchen (*Fusobacterium*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) und 25 % anderer verschiedenster Bakterienarten. Mit fortschreitender Parodontitis nimmt der Anteil der anaeroben gram-negativen Keime bis zu 90 % zu (Sanderink 2004).

2.3.2 Kario- und parodontopathogene Mikroorganismen

Für die Ätiologie der Karies und der Parodontitiden spielen von den über 700 in der Mundhöhle nachgewiesenen Mikroorganismen nur einige Spezies eine besondere Rolle (Paster et al. 2001). Hierzu zählen vor allem die kariogenen Keime *S. mutans*, *S. sobrinus* und *Laktobazillen* sowie die parodontopathogenen Spezies *A. naeslundii* (auch beteiligt an Wurzelkaries), *A. viscosus* (zeigen ebenfalls kariogene Wirkung), *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum*.

Streptococcus mutans

S. mutans gehört zur Familie der Streptococcaceae und zur Gattung Streptococcus. Es handelt sich um ein säuretolerantes, gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches Bakterium. Auf Nährböden bildet *S. mutans* rundliche, konvexe Kolonien mit granulierter Oberfläche. Bei Verwendung von Blutagar zeigt der Erreger α - oder γ -Hämolyse (Facklam 1977). Serologisch wird *S. mutans* der Lancefield-Gruppe E zugeordnet (Lancefield 1933). Obwohl Karies durch mehrere azidogene Bakterien verursacht wird, ist *S. mutans* ein Leitkeim. Dies hängt vor allem mit der ausgeprägten Säuretoleranz und mit der Fähigkeit, niedermolekulare Kohlenhydrate (z.B. Saccharose) abzubauen oder in langkettige, zum Teil unlösliche, Polysaccharide (Glucane, Fruktane) umzuwandeln, zusammen. Diese bilden ein Nahrungsreservoir und verleihen dem oralen Biofilm die struktur- und volumengebende klebrige Matrix. Unter anaeroben Bedingungen verstoffwechselt *S. mutans* Kohlenhydrate zu Milch-, Essig- und Propionsäure, unter aeroben Bedingungen nur zu Milchsäure. Hierbei kommt es zum pH-Wert-Abfall und bei Werten $< \text{pH } 5,5$ zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Die meisten Keime, mit Ausnahme des ebenfalls azidurischen *Lactobacillus*, sind unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage, sich zu vermehren. Nahrungskonkurrenten werden so ausgeschaltet. *S. mutans* ist außerdem in der Lage, synthetisierte langkettige Polysaccharide intrazellulär in Glykogenform zu speichern und so längere Hungerphasen zu überstehen. Wenn der Zuckervorrat in der Plaque verbraucht ist, werden diese intrazellulären Polysaccharide metabolisiert, wodurch sich der kariogene Angriff verlängert. Die Höhe der Bakterienkonzentration im Speichel korreliert daher eng mit einem erhöhten Kariesrisiko (Sharma und Somani 2009).

Streptococcus sobrinus

S. sobrinus gehört ebenfalls zur Familie der Streptococcaceae, zur Gattung Streptococcus und zur *Mutans*-Gruppe. Es handelt sich um ein säuretolerantes, gram-positives, fakultativ anaerobes unbewegliches Bakterium, das auf Blutagar mit α - oder γ -Hämolyse wächst. Nach Lancefield (1933) gehört *S. sobrinus* zur serologischen Gruppe E. Neben *S. mutans* ist *S. sobrinus* bedeutend an der Kariesätiologie beteiligt. Während *S. mutans* auch in kariesinaktiven Individuen isolierbar ist, tritt *S. sobrinus* nur bei kariesaktiven Personen auf. Erst ein kariogenes Milieu mit niedrigem pH-Wert und hohem Zuckerangebot ermöglicht das Überleben und Wachstum von *S. sobrinus* neben *S. mutans*. Innerhalb der *Mutans*-Gruppe ist *S. sobrinus* jedoch der stärkste Säurebildner (Sanderink 2004).

Laktobazillen

Lactobacillus-Arten sind mikroaerophile, säuretolerante, gram-positive, gerade unverzweigte Stäbchen, die in der Länge variieren können. *Laktobazillen* sind in der Natur weit verbreitet. Sie gehören zur körpereigenen, autochthonen Mikroflora des Menschen und sind hier in der Mundhöhle, im Magen-Darm-Trakt (Bernhardt 1974, Reuter 2001) und vaginal als so genannte Döderlein-Stäbchen nachweisbar. In der menschlichen Mundhöhle treten *Laktobazillen* insbesondere in fortgeschrittenen kariösen Läsionen auf (Ahumada et al. 1999) und können hier als Indikatorkeim für die Kariesaktivität herangezogen werden. Eine Keimzahl von mehr als 10^5 CFU/ml gilt als Hinweis auf eine erhöhte Kariesaktivität (Loesche et al. 1984, De Soet und De Graaff 1998, Nishimura et al. 1998). *Laktobazillen* verstoffwechseln Kohlenhydrate zu Milchsäure. Während die Bakterien der Mutans-Gruppe schnellere Säurebildner sind, bewirken *Laktobazillen* einen größeren Abfall des lokalen pH-Wertes.

Actinomycetaceae

Aktinomyceten, die auch als „Strahlenpilze“ bezeichnet werden, sind Fadenbakterien, die dazu neigen, in verzweigten Geflechten zu wachsen. Ihre Ähnlichkeit mit echten Pilzen beschränkt sich jedoch nur auf das myzeliale Wachstumsverhalten. Mikroskopisch stellen sie sich als gram-positive, verzweigte Stäbchen dar, die sich kapnophil vermehren. In der Mundhöhle lassen sich vor allem die Spezies *A. naeslundii* und *A. viscosus* (heute auch als *A. naeslundii* Genospezies-2 bezeichnet) und weitere *ssp.* wie *A. israelii*, *A. gerorgiae*, *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes* und *A. meyeri* nachweisen. *A. naeslundii* bindet an Pellikelpoteinen (saure prolinreiche Proteine) und gehört damit zu den Pionierkeimen der dentalen Plaque (Stenudd et al. 2001, Sanderink et al. 2004). *Aktinomyceten* fermentieren Kohlenhydrate zu Säuren. Die ätiologische Rolle der *Aktionmyces ssp.* ist jedoch bei der koronalen Karies bzw. Schmelzkaries noch unklar; sie sind aber bei der Entstehung der Wurzelkaries ätiologisch bedeutsam (Featherstone JD 1994, Fitzgerald RJ et al. 1994). *Aktinomyceten* setzen bei erhöhtem Angebot von Kohlenhydraten bzw. bei niedrigem Stickstoffangebot Urease frei. Hiermit schützen sie sich gegen eine zu starke Ansäuerung der unmittelbaren Umgebung und haben durch Alkalisierung der Plaque sogar eine gewisse kariesprotektive Wirkung. *Aktinomyceten* werden ebenfalls aus subgingivalen Plaqueproben isoliert. Mit zunehmender parodontaler Entzündung nimmt ihre Anwesenheit, bedingt durch die starke Zunahme gram-negativer parodontalpathogener Keime, ab. *Aktinomyceten* besitzen jedoch parodontopathogene Eigenschaften. Sie aktivieren Plasmazellen, sezernieren

Chemotaxine für neutrophile Granulozyten und bewirken die Freisetzung von gewebelysierenden Enzymen aus Wirtszellen. Sie fördern den Knochenabbau durch Stimulierung von Osteoklasten und die Haftung sowie das Wachstum des parodontalpathogenen Keimes *P. gingivalis*. Außerdem bilden sie weitere Koaggregate mit *Fusobakterien* und *Veillonellen* (Sanderink 2004).

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis gehört zur Familie der *Bacteroidaceae* und zur Gattung *Porphyromonas* (früher Gattung *Bacteroides*). Es handelt sich um ein gram-negatives, sporenloses, obligat anaerobes, schwarzpigmentierendes, unbewegliches, sehr kurzes, kokkoides Stäbchenbakterium. Eine Vielzahl von Virulenzfaktoren macht *P. gingivalis* ausgesprochen widerstandsfähig und zu einem der wichtigsten parodontopathogenen Keime. Er ist in der Lage, polymorphkernige neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität zu unterdrücken. Er weist eine Kapsel auf und ist so weitgehend gegen Phagozytose geschützt. Er kann in Epithel- und Bindegewebszellen eindringen und entzieht sich so der Reichweite schützender Antikörper (Lamont et al 1995). Für die Chronizität der Parodontalerkrankungen scheint die Fähigkeit von *P. gingivalis* zur Zellinvasion eine Schlüsselrolle zu spielen (Eick et al. 2002). *P. gingivalis* verfügt über Proteasen (v.a. Gingipaine), die einige Effektmoleküle der Immunabwehr (z.B. IgA und IgG) inaktivieren. Die Proteasen sind zytotoxisch und schädigen das umliegende Bindegewebe (Kumagai et al. 2005). Sie erhöhen weiterhin die vaskuläre Permeabilität und damit klinisch sichtbar, die gingivale Blutungsneigung und die Gingivaödembildung (Sanderink 2004). *P. gingivalis* bindet mit Hilfe seiner Fimbrien nicht nur an die Pellikeloberfläche (Amano et al. 1994), sondern auch an Wirtszellen, wie Epithelzellen (Isogai et al. 1988, Weinberg et al. 1997), Fibroblasten, Erythrozyten (Amano et al. 1995), und bildet mit einer Vielzahl von anderen Spezies (z.B. *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, einige *Streptokokken ssp.*) Koaggregate. Weitere Virulenzfaktoren sind die Lipopolysaccharide, die eine Freisetzung von Zytokinen aus Wirtszellen bewirken und somit Induktoren der entzündlichen Parodontolyse sind. Hämolytine führen zur Freisetzung von Eisen und kapsulären Polysacchariden und verhindern eine Phagozytose durch Granulozyten. Von *P. gingivalis* gebildete Metabolite, wie organische Säuren, Ammoniak und Schwefelwasserstoff, wirken toxisch auf Fibroblasten und Epithelzellen und bewirken so eine Schädigung des Gewebes. *P. gingivalis* gehört nicht zur normalen Mundflora und zeigt bei parodontal gesunden Personen eine niedrige Prävalenz. Als sekundärer Besiedler trägt *P. gingivalis* wesentlich zur Auslösung und Progression schwerer

Parodontitiden bei (Sixou 2003). In parodontalen Taschen kann er fast die Hälfte der kultivierbaren gram-negativen Isolate ausmachen (Slots und Gibbons 1978).

Prevotella intermedia

Eine häufig mit *P. gingivalis* assoziierte Spezies ist das Bakterium *P. intermedia* (Kamaguchi et al. 2001). Die Gattung *Prevotella* wurde 1990 definiert und geht einerseits aus der *Bacteroides-oralis*-Gruppe und andererseits aus der *Bacteroides-melaninogenicus*-Gruppe hervor. Die *Prevotella-intermedia*-Gruppe setzt sich aus *P. intermedia*, *P. nigrescens* und *P. pallens* zusammen (Shah und Gharbia 1993). Bei *P. intermedia* handelt es sich um ein gram-negatives, obligat anaerobes, schwarzpigmentierendes, kurzes, kokkoides Stäbchen. Auch *P. intermedia* besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die den Keim zu einem wichtigen parodontopathogenen Bakterium machen. *P. intermedia* hat die Fähigkeit, fimbrienvermittelt in Epithelzellen einzudringen (Dorn et al. 1998) und sich so vor Abwehrmechanismen zu schützen. Zellwandproteine lösen die Bildung von Zytokinen durch die Wirtszelle aus und setzen so die Parodontolyse in Gang. *P. intermedia* ist zur Hämolyse fähig und kann so die notwendige Eisenversorgung sicherstellen. Er verfügt über Proteasen, die Immunglobuline abbauen, und über Toxine, die gewebsschädigende Wirkung haben. *P. intermedia* ist in der Lage, aus Glukose intrazelluläre Polysaccharide zu bilden, die als Speicherstoff einen Selektionsvorteil bieten. Bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis ist *P. intermedia* in subgingivalen Plaqueproben nachweisbar (Mombelli et al. 2002). Aber auch im gesunden Parodontium kann *P. intermedia* nachgewiesen werden (Maeda et al. 1998).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans ist ein kokkoides, gram-negatives, nicht sporenbildendes, unbewegliches Stäbchen, das fakultativ anaerob (kapnophil, 5-10 % CO₂-Zusatz) wächst. Ätiologisch wird ein Zusammenhang mit aggressiven Parodontitiden nachgewiesen (Zambon 1985). Die Pathogenität ist durch eine Reihe von Virulenzfaktoren bedingt. *A. actinomycetemcomitans* ist in der Lage, mittels Invasinen in das Gingivaepithel einzudringen und sich dort, geschützt vor humoraler Abwehr, zu vermehren (Meyer et al. 1991 und 1996). Weiterhin wird Leukotoxin gebildet (Tsai et al. 1979). Leukotoxin führt in hohen Konzentrationen zur Schädigung der Zellmembran von Monozyten (Taichman et al. 1980) sowie neutrophilen Granulozyten (Zambon et al. 1983) und bedingt so deren osmotische Lyse. Weitere Virulenzfaktoren sind Stoffe, die die Chemotaxis von

polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten hemmen, sowie Zytotoxine, die toxisch auf Fibroblasten und Epithelzellen wirken. Kollagenasen zerstören das wichtige Faserprotein und somit die bindegewebige Integrität. Weitere Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharide und CPA (capsular-like polysaccharide antigen) bewirken eine Stimulation der Osteoklasten und eine Apoptose der Osteoblasten und fördern so den Knochenabbau. Außerdem hemmt *A. actinomycetemcomitans* die Zellteilung und -proliferation von Epithelzellen, was eine verzögerte Heilung von infiziertem Gewebe bedingt (Sanderink et al. 2004). *A. actinomycetemcomitans* ist in der Lage, an pellicelbedeckter Zahnhartsubstanz in einer gingivitisfreien Mundhöhle als Pionierkeim hochaffin mittels Adhäsinen zu binden. Er ist in mindestens 10 % der Milchgebisse bei parodontal gesunden Kindern vorhanden. Als Pionierkeim ist er vor allem mit aggressiven Parodontitisformen assoziiert. Besonders der JP2-Klon des Serotyps B von *A. actinomycetemcomitans* weist eine hohe Aggressivität auf. Träger des JP2-Klons haben, im Vergleich zu Probanden, bei denen kein *A. actinomycetemcomitans* gefunden wurde, ein 18-fach höheres Risiko, an aggressiver Parodontitis zu erkranken (Haubek et al. 2008).

Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum gehört ebenfalls zur Familie der *Bacteroidaceae* und zur Gattung *Fusobacterium*. Mikroskopisch zeigt es sich als gram-negativer, faden- oder spindelförmiger Keim. Die Spezies ist unbeweglich und obligat anaerob. *F. nucleatum* koaggregiert mit nahezu allen oralen Bakterienspezies und dient so als Brücke für Pionier- und ansonsten schlecht haftende pathogene Nachfolgerkeime, wie *P. gingivalis* (Kolenbrander et al. 1995, Bolstad et al. 1996). *F. nucleatum* nimmt so eine Schlüsselrolle bei der parodontopathogenen Biofilmbildung ein und ist an der Entstehung von Gingivitiden und Parodontitiden beteiligt. Die Anwesenheit bestimmter Gemeinschaften und Koaggregate von parodontopathogenen Bakterien weist synergetische Effekte in Bezug auf Virulenz und Pathogenität auf. Die genaue parodontopathogene Bedeutung ist jedoch noch nicht geklärt. So wird *F. nucleatum* einerseits bei parodontal gesunden Probanden gefunden, andererseits in aktiven parodontalen Läsionen sowie in erfolgreich behandelten oder gesunden Stellen derselben Probanden nachgewiesen (Dzink et al. 1985, Moore und Moore 1994, Suchett-Kaye et al. 1999). Zu den Virulenzfaktoren von *F. nucleatum* zählen vor allem die Hämagglutination, die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung sowie zytotoxische Aktivitäten, z.B. toxisch und antigen wirkende äußere Membranproteine (Bakken und Jensen 1986).

2.3.3 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR)

Da eine Vielzahl oraler bakterieller Spezies schlecht kultivierbar ist (Munson et al. 2002, Rolph et al. 2001), die analytische Sensitivität kultureller Verfahren gering ist (Petersen 2008), Divergenz und Konvergenz verschiedener Spezies zu Fehlinterpretationen führen können (Tanner et al. 1992) und eine sofortige Verarbeitung der Proben nicht immer möglich ist, eignen sich für die mikrobiologische Analyse kario- und parodontopathogener Bakterienspezies besonders kulturunabhängige Verfahren. Vergleichende Untersuchungen von Kultur- und PCR-Verfahren belegen bei subgingivalen Plaqueproben die Effizienz der molekularbiologischen Methoden (Sakamoto et al. 2001, Eick et al. 2002). Die Methodik der PCR hat den Vorteil, auch unkultivierbare Spezies oder nicht vitale Spezies (Siqueira et al. 2003, Sakamoto et al. 2001) nachzuweisen. Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus, und die Probenaufbereitung und -lagerung sind zeitlich flexibel (Petersen 2008).

Die PCR basiert auf einer Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA. Die In-vitro-Amplifikation von DNA wurde 1983 von *Kary Mullis* zum ersten Mal beschrieben. Er wurde für diese Erfindung 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Müller 2001). 1985 publizierten *Saiki et al.* die erste PCR-Veröffentlichung.

Das Prinzip der PCR beruht auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA (dsDNA) bei 95° C, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Doppelstränge zusammenhalten, aufbrechen. An den Einzelsträngen lagern sich dann bei herabgesetzter Temperatur auf 60-40° C am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs kurze komplementäre Oligonucleotide (Primer) an (Annealing). Diese werden von einer DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert (Elongation). Die heute am häufigsten verwandte hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase (Saiki et al. 1988) elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang so lange, bis die Reaktion durch wiederholte Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95° C abgebrochen wird. Hierbei kommt es zur wiederholten Denaturierung der dsDNA. Der Zyklus kann erneut beginnen (Abbildung 2). Das Ergebnis ist eine exponentielle Vervielfältigung neuer DNA (Müller 2001, Petersen 2008). Konventionelle PCR-Verfahren sind qualitative oder modifiziert semiquantitative Nachweisverfahren.

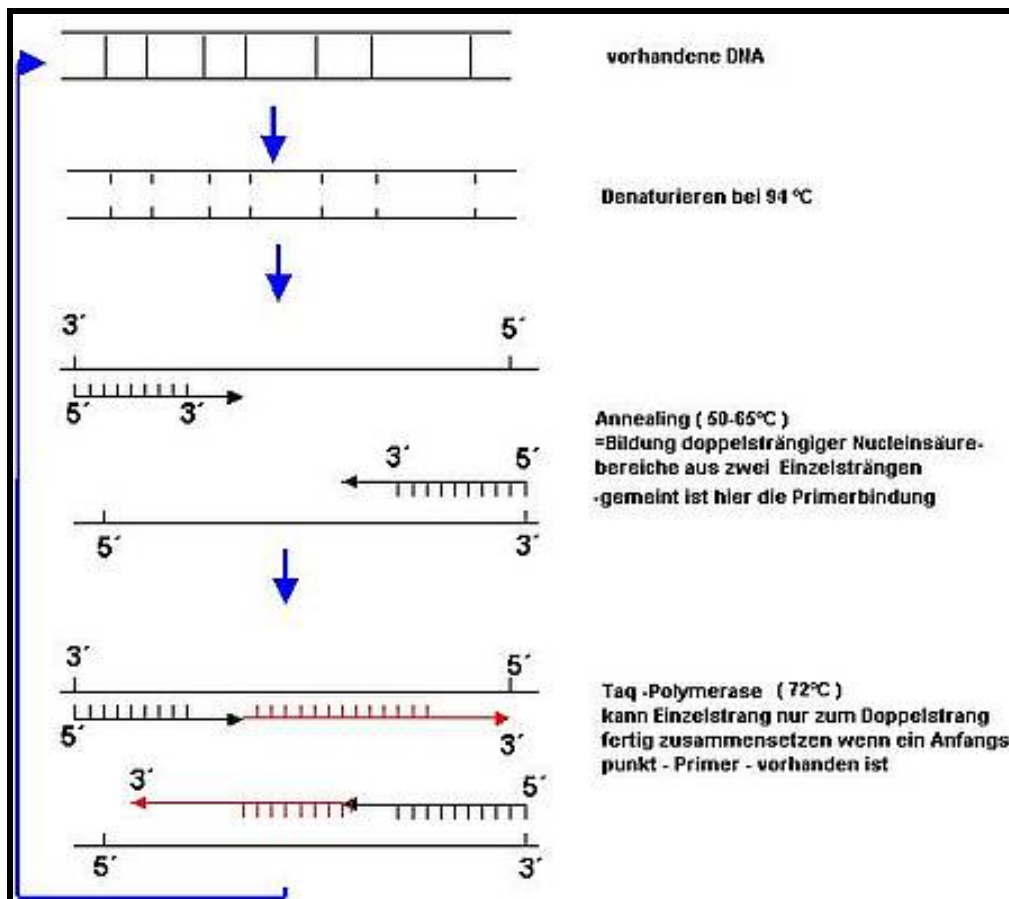


Abbildung 2: Prinzip der PCR (©Bioron GmbH)

2.3.4 Prinzip der Real-time-PCR

Die Real-time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt aber eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte während des Reaktionsablaufs in „real-time“ mit Hilfe eines Fluorophores. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung nicht wie in der herkömmlichen PCR in der Plateauphase, sondern in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Diese PCR wird daher auch als Real-time-PCR bezeichnet, da die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt abgelesen werden kann (Freemann et al. 1999). Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, bei denen erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung, meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, vorgenommen wird. Das Prinzip der Detektion des eingesetzten Fluorophores basiert auf Anregung (Extinktion) durch kurzwelliges Licht, worauf höherwelliges Licht emittiert wird. Die Emission wird von einer optischen Detektionseinheit z.B. im Rotor-Gene 2000 pro Zyklus gelesen und die Fluoreszenzintensität ausgewertet. Für den unspezifischen Nachweis

von dsDNA hat sich das Fluorophor SYBRGreen™ durchgesetzt (Müller 2001, Zipper 2004). Dieses Molekül kann zwischen doppelsträngigen Nucleinsäuren eingebunden (interkaliert) werden und emittiert bei einer Wellenlänge von λ 510 nm nach einer Extinktion bei λ 470 nm (Corbett 2000). Als Vorteil für die Real-time-PCR erweist sich die Quantifizierung der Bakterienzahl. So können Verlaufskontrollen z.B. parodontaler Erkrankungen beurteilt werden (Sixou 2003). Die Technik der Real-time-PCR weist eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Quantifizierung von Bakterienspezies auf (Socransky und Haffajee 2005) und erlaubt die Bestimmung nicht vitaler Bakterien, was sich als großer Vorteil bei längeren Transportwegen und Lagerzeiten von Probenmaterial erweist.

3 ZIELE DER ARBEIT

Das Ziel des epidemiologischen Teils der vorliegenden Arbeit war es, im Rhein-Kreis Neuss (NRW, Deutschland) bei Kindergarten- und Grundschulkindern im Alter von 2-10 Jahren, die Black-stain-Prävalenz in Beziehung zur Kariesprävalenz und -erfahrung sowie zum Migrationshintergrund zu erfassen.

Im epidemiologischen Teil der Studie sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

Hypothese 1: Black stain hat eine kariesprotektive Wirkung.

Hypothese 2: Das Vorkommen von black stain ist positiv assoziiert mit einem Migrationshintergrund der Kinder.

Das Ziel des mikrobiologischen Teils der vorliegenden Arbeit war es, die kario- und parodontopathogenen Keime in Black-stain-Proben und in nichtkolorierten Plaqueproben mittels molekularbiologischer Verfahren (PCR) zu bestimmen und miteinander zu vergleichen.

Die mikrobiologischen Untersuchungen sollten folgende Hypothesen überprüfen:

Hypothese 3: Die bakterielle Zusammensetzung von black stain unterscheidet sich von der bakteriellen Zusammensetzung der normalen nichtkolorierten Plaque.

Hypothese 4: Die spezielle bakterielle Zusammensetzung von black stain ist verantwortlich für die niedrige Kariesprävalenz und -erfahrung der Black-stain-Träger.

4 MATERIAL UND METHODE

4.1 Epidemiologische Untersuchung zu black stain

4.1.1 Probandengut

Im Rahmen der zahnärztlichen Reihenuntersuchung nach SGB 5 § 21 wurden im Rhein-Kreis Neuss (Raum Dormagen, NRW, Deutschland) 7624 Kinder (2878 Kindergarten- und 4746 Grundschulkinder) im Alter von 2-10 Jahren zunächst auf das Vorkommen von black stain untersucht.

Das Kriterium für die Diagnostik von black stain war das Vorliegen von fest am Zahnschmelz anhaftenden schwarzen Ablagerungen, die in der Regel lineare Verfärbungen parallel zum Gingivarand bilden und sich gelegentlich bis auf das untere Drittel der Zahnkrone oder höher ausbreiten können. Es wurde nur das Auftreten oder Fehlen von black stain dokumentiert. Eine Differenzierung in Schweregrade des Black-stain-Befalls wurde nicht vorgenommen.

Aus dem Probandengut wurden 113 Kinder mit Black-stain-Befall ermittelt und zur Black-stain-Gruppe zusammengefasst. Um eine Selektionsbias zu vermeiden, erfolgte die Auswahl der Kontrollgruppe zufällig. Nach jedem erfassten Kind mit black stain wurden die nächsten 3 zu untersuchenden Kinder in die Studie einbezogen, und bildeten mit insgesamt 339 (3x113) Kindern die Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird in Grafiken die Kontrollgruppe mit **olivegrüner Farbe** und die Black-stain-Gruppe mit **roter Farbe** unterlegt.

Tabelle 8: Übersicht zur Zusammensetzung des Probandengutes

	Gesamtkollektiv (n=7624)	Black-stain-Gruppe (n=113)	Kontrollgruppe (n=339)
Kindergartenkinder (Alter 2-6 Jahre)	2878	41	123
Grundschulkinder (Alter 6-10 Jahre)	4746	72	216

4.1.2 Klinische Untersuchung und schriftliche Befragung der Eltern

Die zahnärztliche Untersuchung erfolgte durch eine kalibrierte und epidemiologisch erfahrene Zahnärztin (B.B.). Systematische Fehler (Bias), die aufgrund von unterschiedlichen Untersuchern und deren Interpretation von Befunden entstehen, konnten so vermieden werden. Für die kariesepidemiologische Diagnostik der Untersucherin wurde ein κ -Wert von 0,925 für die Interrater-Reliabilität ermittelt.

Als Hilfsmittel zur intraoralen Diagnostik standen eine künstliche Lichtquelle (Halogenlampe Firma Waldmann, HX 35 N, Nr. 101461, 230 V, 50/60 Hz, 35 W), Mundspiegel und eine Parodontalsonde zur Verfügung.

Die Eltern wurden gebeten, am Untersuchungstag mit ihren Kindern vor dem Kindergarten- bzw. Schulbesuch die Zähne zu putzen. Die Befundaufnahme erfolgte im Kindergarten bzw. in der Schule zwischen 9.00 und 11.30 Uhr. Von den Kindern der Black-stain- und der Kontrollgruppe wurde nach WHO-Standard (1997) für das Milchgebiss der dmft-Index (Klein et al. 1938) erhoben und auf einem Befundbogen anonymisiert durch eine fortlaufende Untersuchungsnummer dokumentiert. Dabei reflektiert die d-Komponente den Anteil kariös zerstörter (decayed) Zähne, die m-Komponente den Anteil infolge Karies extrahierter (missing) Zähne und die f-Komponente den Anteil gefüllter (filled) Zähne. Nach dem WHO-Standard (1997) werden Kariesläsionen erst auf Dentinkariesniveau (d3, d4) registriert. Schmelzläsionen (Initialkaries, d1, d2) werden nicht berücksichtigt. Als fehlend (m) wurden nur Zähne bewertet, die ausschließlich wegen ihrer kariöser Zerstörung extrahiert waren. Zahnverluste infolge einer kieferorthopädischen Behandlung und anderer nicht kariös bedingter Gründe wurden nicht als m registriert. Gefüllte Zähne (f) wurden unabhängig von der Füllungsart dokumentiert. Defekte Füllungen oder Füllungen mit Sekundärkaries wurden als kariös (d) erfasst.

Die Eltern der untersuchten Kinder wurden mit einem anonymisierten (fortlaufende Untersuchungsnummer, siehe oben) Fragebogen (Anhang 9.1) schriftlich zu Geschlecht, Alter, Einrichtung (Kindergarten/Schule), Geburtsland des Kindes und Geburtsland der Eltern befragt. Um Störgrößen auszuschließen, wurde ebenfalls nach Erkrankungen und einer möglichen Medikation der Kinder gefragt. Kinder mit einer Grunderkrankung bzw. solche, mit regelmäßiger Medikation wurden nicht in die Studie einbezogen.

Personen, die nicht an einer Studie teilnehmen, unterscheiden sich im Allgemeinen von denen, die bereitwillig Auskunft geben. Demografische, sozioökonomische und kulturelle Hintergründe spielen hier eine Rolle (Ronmark 1999). Daher wurde in enger Zusammenarbeit mit den Erziehern und Lehrern versucht, den Non-responder-Anteil so gering wie möglich zu halten. Eltern wurden mehrfach aufgefordert, an der Befragung teilzunehmen. Der Fragebogen wurde ins Türkische übersetzt, und die Pädagogen wurden gebeten, den Eltern beim Ausfüllen der Bögen behilflich zu sein.

Insgesamt konnten 447 klinische Befundbögen und 262 komplett ausgefüllte Fragebögen statistisch ausgewertet werden. 5 Befundbögen konnten aufgrund einer Grunderkrankung

bzw. Medikation der Kinder nicht mit einbezogen werden. Ein Selektionsfehler in Bezug auf die Fragebögen musste in Kauf genommen werden.

Nach der Befragung wurde die Migrationserfahrung nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schlüssel dokumentiert. Um eine weitere Bias auszuschließen, erfolgte die zahnärztliche Befunderhebung unabhängig von der Dokumentation der Fragebögen, so dass der Untersucher die Angaben zur Migrationserfahrung erst erfuhr, nachdem die Befunddaten erhoben waren.

Tabelle 9: Definition und Einteilung des Migrationsgrades der Probanden

Migrationsgrad	Definition
0	Kind und Eltern in Deutschland geboren
1	Kind in Deutschland geboren, ein Elternteil im Ausland geboren
2	Kind in Deutschland geboren, beide Elternteile im Ausland geboren
3	Kind und Eltern im Ausland geboren

4.2 Mikrobiologische Untersuchung von Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben

4.2.1 Probandengut, Entnahme und Lagerung des Probenmaterials

Nach Zustimmung der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena (Bearbeitungsnummer 1921-12/06) wurden die Eltern der Grundschüler schriftlich über das Anliegen der Studie informiert und um ihr Einverständnis zur Teilnahme ihrer Kinder an der Probenentnahme gebeten (Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung, Anhang 9.2). Die Kinder waren alle im Alter von 6 bis 10 Jahren; es lag ein frühes bzw. spätes Wechselgebiss vor. Von 46 Kindern wurden Black-stain-Proben (Black-stain-Gruppe) und von 47 Kindern ohne Black-stain-Ablagerungen auf den Zähnen nichtkolorierte Plaqueproben (Kontrollgruppe) entnommen. Um eine demografische und soziale Selektionsbias zu vermeiden, wurden die Kinder der Kontrollgruppe nach der „Beste/r-Freund/in-Methode“ ausgewählt.

Die Entnahme der Plaqueproben erfolgte im Zeitraum von Juli bis November 2008 während der zahnärztlichen Reihenuntersuchung im Rhein-Kreis Neuss. Die Eltern wurden gebeten, am Tag der Probenentnahme nach dem Frühstück mit ihrem Kind die Zähne zu putzen. Die Probenentnahme erfolgte in der Schule zwischen 10.00 und 10.30 Uhr. Die Proben wurden mit sterilen Exkavatoren entnommen, die zuvor mindestens 6 Stunden in einer 5 %igen

NaOCl-Lösung gelagert waren, um eventuelle DNA-Anhaftungen zu eliminieren. Danach wurden die Instrumente gut abgespült, steril verpackt und autoklaviert.

Die Probenentnahme erfolgt an der Buccalfläche eines oberen Milchmolaren und an der Lingualfläche eines unteren Inzisivus. Die entnommenen Proben wurden auf steril verpackte endodontische Papierspitzen übertragen und in DNA- und RNA-freien Eppendorfhütchen (Safe Lock Tubes, Biopur) bei -60°C bis zur Probenbearbeitung aufbewahrt.

4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungsmethode mittels DNA-Isolation und Real-time-PCR

Für die mikrobiologische Analyse der Proben eigneten sich nur kulturunabhängige Verfahren, da eine sofortige Verarbeitung der Proben nicht möglich war. Daher wurde das am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena etablierte Verfahren der Real-time-PCR gewählt, das auch den quantitativen Nachweis nicht vitaler Bakterien erlaubt (Petersen 2008, Siqueira et al. 2003, Sakamoto et al. 2001).

Nach der DNA-Isolation der gewonnenen Proben wurde die Real-time-PCR mit dem Thermocycler Roter-Gene 2000 (Corbett, Sydney, Australien) durchgeführt.

DNA-Isolation

Zur Durchführung der PCR wurden die Proben aufgetaut und die DNA-Isolation mit dem Testkit „Genomic Mini for universal genomic DNA Isolation“ (A&A Biotechnology, Gdynia, Polen) durchgeführt.

Hierzu wurden nach Arbeitsanleitung 100µl „Tris Buffer TB“ (10mM TrisHCl pH 8,5), 200µl „Total Lysis buffer TL“ und 20µl „Proteinase K“ in die Eppendorfprobehütchen pipettiert.

Es folgten ein Mischen auf dem Vortex für 20 Sekunden und eine Inkubation bei 37°C für 20 Minuten. Danach wurden die Proben für weitere 5 Minuten bei 70°C inkubiert und nochmals für 20 Sekunden auf dem Vortex durchmischt. Die Proben wurden für 2 Minuten bei 10 000 U/min zentrifugiert, der Überstand in die vorgesehenen Zentrifugations-Wasch-Säulen überführt und nochmals für 1 Minute bei 10 000 U/min zentrifugiert.

Es folgten der 1. Waschvorgang mit 500 µl „Wash Solution A1“ bei einer 1-minütigen Zentrifugation mit 10 000U/min und ein 2. Waschvorgang mit 400µl „Wash Solution A1“ bei einer 2-minütigen Zentrifugation mit 10000 U/min.

Zum Eluieren der DNA wurde 100 µl 75°C warmer „Tris Buffer TB“ hinzugefügt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 10 000 U/min zentrifugiert.

Das DNA-Isolat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Tubes aufgefangen und bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

Real-time-PCR mit Rotor-Gene 2000

Die technische Umsetzung der Real-time-PCR wurde mit dem Thermocycler Roter-Gene 2000 (Corbett, Sydney, Australien) durchgeführt.

Bei der Real-time-PCR wird die Messung der DNA-Menge in Echtzeit vorgenommen, die mit dem im Reaktionsgefäß befindlichen Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green umgesetzt werden kann. Der Farbstoff lagert sich an die doppelstrangige DNA an und wird im Detektor des Gerätes bei $\lambda = 470\text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt; die Emission wird bei $\lambda = 510\text{ nm}$ digital gemessen (Corbett 2000).

Bei korrekter Amplifikation ergeben sich exponentielle Wachstumsraten der DNA-Amplifikate, die sich durch eine Zunahme der Fluoreszenzsignale nachweisen lassen. Durch Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration wird die bakterielle DNA-Menge anhand der erstellten Standardkurve ermittelt. Pro PCR-Durchlauf konnten mit dem Rotor-Gene 2000 maximal 36 Proben untersucht werden. Sie setzten sich aus insgesamt 32 klinischen Proben, 3 Standardproben und einer Negativkontrolle zusammen.

Zur Durchführung der Real-time-PCR wurden die DNA-Isolate aufgetaut und vorsichtig gemischt. Das weitere Vorgehen der Probenzubereitung erfolgte auf Eis.

Zunächst wurde der Mastermix für 36 Proben wie folgt hergestellt (die Menge entspricht einem Pipettivolumen von 37 Proben, da ein Reservevolumen für den Pipettieverlust mit eingerechnet wurde):

- 290,5 μl Wasser
- 74,0 μl Taq-Puffer (dem Puffer wurde 1 μl SYBR®Green zugesetzt)
- 79,5 μl 2,75mM MgCl_2
- 74,0 μl 2mM dNTP's
- 37,0 μl Forward-Primer
- 37,0 μl Reverse-Primer
- 37,0 μl Wasser
- 37,0 μl Taq DNA-Polymerase

Mit Ausnahme der Primer wurden die Reagenzien von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

Die Synthese und Bereitstellung der Primer erfolgte durch das Institut für Virologie des Universitätsklinikums Jena. Die optische Dichte war für jeden Primer in der gelieferten Lösung bekannt. Daher konnte die erforderliche Konzentration der Primer in der PCR vorbereitet werden. Anschließend fand die Lagerung der Primer bei -20° C statt.

Verwendete Real-time-PCR-Primer:

- Gesamtzahl der Bakterien (Ashimoto et al. 1996)
- *A. actinomycetemcomitans* (Ashimoto et al. 1996)
- *A. naeslundii* (Xia u. Baumgartner 2003)
- *A. viscosus* (Xia u. Baumgartner 2003)
- *F. nucleatum* (Fouad et al. 2002)
- Laktobakterien (Byun et al. 2004)
- *P. gingivalis* (Ashimoto et al. 1996)
- *P. intermedia* (Ashimoto et al. 1996)
- *S. mutans* (Yoshida et al 2003)
- *S. sobrinus* (Yoshida et al 2003)

Es folgte die Zubereitung des Reaktionsgemisches aus 2 µl DNA-Isolat bzw. für die Negativkontrolle 2 µl Wasser und für die Standards 2 µl der entsprechenden Standardverdünnung plus 18 µl Mastermix.

Nach dem Einbringen der Proben in das Karussell wurde der Rotor-Gene 2000 wie folgt programmiert:

- 5 Minuten Denaturierung bei 94° C
- 45 Zyklen:
 - Denaturierung 15 Sekunden bei 94° C
 - Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA 20 Sekunden bei:
 - 58° C für *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*
 - 60° C für *P. gingivalis* und *F. nucleatum*
 - 63° C für *S. mutans*, *S. sobrinus* und Gesamtkeimzahl
 - 65° C für *A. naeslundii* und *A. viscosus*
 - 67° C für Laktobakterien
 - Polymerisation 20 Sekunden bei 72° C
 - Messung des Signals bei 72° C und $\lambda = 510 \text{ nm}$

- Vollständige Dimerisierung bei
 - 40° C für 120 Sekunden
 - 60° C für 60 Sekunden
- Die Schmelzkurvenanalyse wurde im Bereich von 50° C bis 99° C durchgeführt.

4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 15.0.

Zum Vergleich von Mittelwerten (z.B. d-, m-, f- und dmft-Wert) wurde der t-Test durchgeführt.

Zur Darstellung der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit der epidemiologischen Variablen und damit indirekt des Zusammenhangs der Merkmale (z.B. Vorkommen von black stain und Migrationshintergrund) wurde der Chi-Quadrat-Test herangezogen.

Zur Verifizierung signifikanter Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung von Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben der beiden unabhängigen Probandengruppen (Black-stain-Gruppe und Kontrollgruppe) wurde der U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt.

Als Schwellenwert für die Signifikanz wurde wie allgemein üblich die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ festgelegt. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p \leq 0,001$ wurden als hochsignifikant beschrieben.

5 ERGEBNISSE

5.1 Epidemiologische Ergebnisse

5.1.1 Prävalenz und geschlechtsbezogene Verteilung von black stain

Von insgesamt 7624 untersuchten Kindern konnte bei 113 black stain diagnostiziert werden. Dieses entspricht einer Gesamtprävalenz von 1,5 %. Die Kindergartenkinder im Alter zwischen 2 und 6 Jahren wiesen eine Black-stain-Prävalenz von 1,4 % auf, die 6- bis 10-jährigen Grundschulkinder eine von 1,5 % (Tabelle 10).

Tabelle 10: Prävalenz von black stain ((n) = Probandenanzahl)

black stain	Kindergartenkinder 2-6 Jahre	Grundschulkinder 6-10 Jahre	Gesamtpopulation 2-10 Jahre
Nein (n)	98,6 % (2837)	98,5 % (4674)	98,5 % (7511)
Ja (n)	1,4 % (41)	1,5 % (72)	1,5 % (113)
Gesamt(n)	100,0 % (2878)	100,0 % (4746)	100,0 % (7624)

Die Verteilung nach Geschlecht innerhalb der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe entsprach ebenso der normalen demografischen Verteilung wie die des untersuchten Gesamtkollektivs. Der t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,929$) zwischen den Geschlechtern im Hinblick auf das Vorkommen von black stain. Beide Geschlechter sind gleich häufig von black stain betroffen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Geschlechtsverteilung innerhalb der Black-stain-Gruppe, der Kontrollgruppe und des Gesamtkollektivs

Geschlecht	Black-stain-Gruppe	Kontrollgruppe	Gesamtkollektiv
Weiblich (n)	51,3 % (58)	52,7 % (176)	52,3 % (234)
Männlich (n)	48,7 % (55)	47,3 % (158)	47,7 % (213)
Gesamt (n)	100,0 % (113)	100,0 % (334)	100,0 % (447)

5.1.2 Vorkommen von black stain in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall

Die Kariesprävalenz des befundeten Gesamtkollektivs von 447 Kindern lag bei 46,5 %. In der Black-stain-Gruppe (113 Kinder) konnte mit 40,7 % eine tendenziell niedrigere Kariesprävalenz als in der Kontrollgruppe (334 Kinder) mit 48,5 % beobachtet werden. Der Chi-Quadrat-Test ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Beim Vergleich des mittleren Kariesbefalls (dt-, mt-, ft- und dmft-Werte) konnten signifikante Unterschiede zwischen der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe beim dt-Wert ($p=0,011$) und hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen beim mt- ($p=0,001$) und dmft-Wert ($p=0,000$) beobachtet werden. Die entsprechenden Werte können Abbildung 3 entnommen werden. Kinder mit black stain hatten mit 1,13 dmft einen signifikant niedrigeren Kariesbefall als Kinder ohne black stain (2,01 dmft). Hypothese 1 dieser Arbeit kann damit bestätigt werden: Black stain ist kariesprotektiv.

Der Mittelwertvergleich des ft-Wertes zwischen der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,071$). Tendenziell konnten bei Kindern der Kontrollgruppe jedoch häufiger gefüllte Zähne beobachtet werden als bei Kindern der Black-stain-Gruppe.

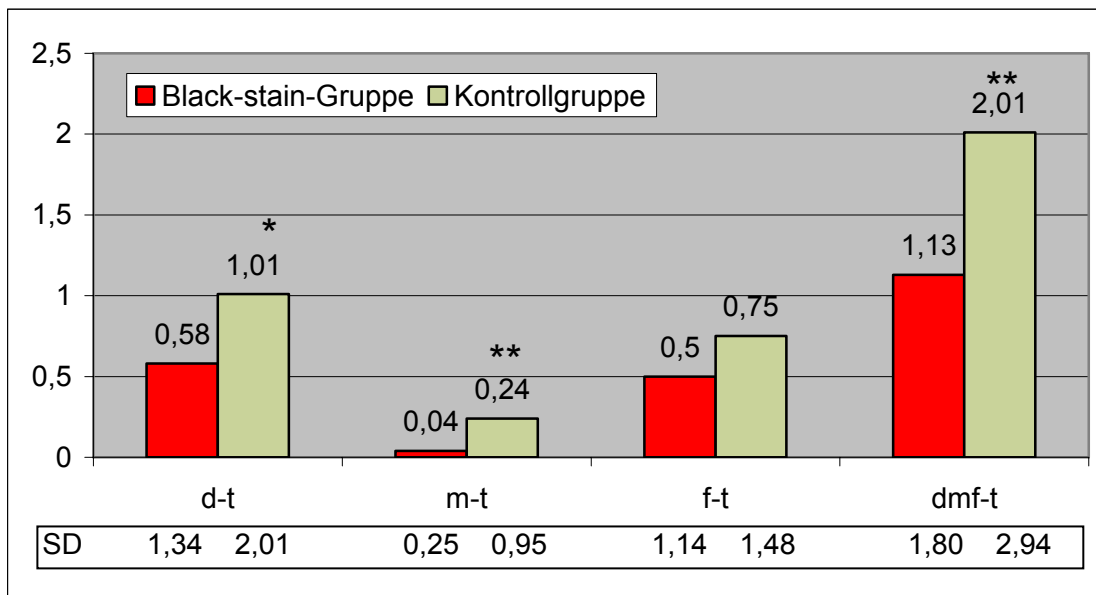


Abbildung 3: Kariesbefall (mittlere dt-, mt-, ft- und dmft-Werte) der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,001$; SD = Standardabweichung)

5.1.3 Vorkommen von black stain in Beziehung zum Migrationshintergrund und zum Migrationsgrad

Insgesamt konnten 262 Fragebögen zum Migrationshintergrund statistisch ausgewertet werden. Bei 69 Kindern dieses Kollektivs war black stain nachweisbar (Black-stain-Gruppe). 41 Kinder (59,4 %) dieser Black-stain-Gruppe hatten einen Migrationshintergrund. Nur 28 Kinder (40,6 %) mit black stain waren deutscher Herkunft. Es konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p=0,000$) zwischen dem Migrationshintergrund der Kinder und dem

Vorkommen von black stain ermittelt werden. Kinder mit Migrationshintergrund wiesen häufiger black stain auf als Kinder ohne Migrationshintergrund.

Schlüsselt man den Migrationshintergrund in die Migrationsgrade 0-3 (Tabelle 9) auf, so ist zu erkennen, dass mit steigendem Migrationsgrad auch der prozentuale Anteil des Vorkommens von black stain zunimmt. Im Chi-Quadrat-Test konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p=0,000$) zwischen dem Migrationsgrad und dem Vorkommen von black stain dargestellt werden. Abbildung 4 zeigt die Häufigkeit des Vorkommens von black stain in Beziehung zum Migrationsgrad der Kinder.

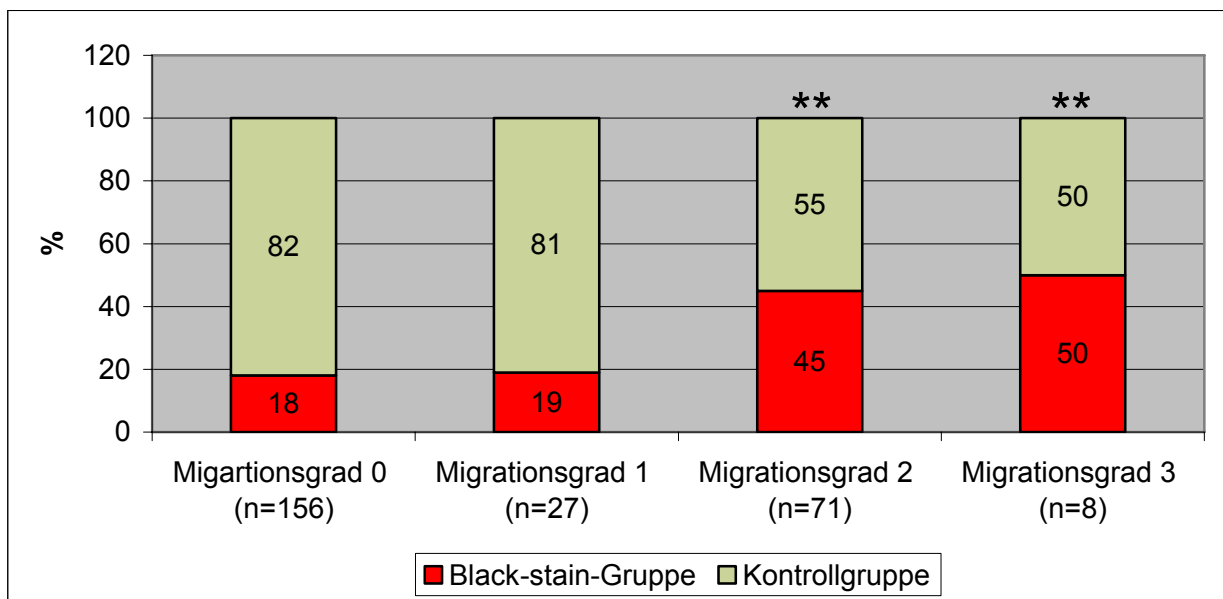


Abbildung 4: Häufigkeit des Vorkommens von black stain in Beziehung zum Migrationsgrad der Probanden (: $p \leq 0,001$)**

Hypothese 2 wird hiermit bestätigt. Kinder mit Migrationshintergrund sind häufiger von black stain betroffen als deutsche Kinder.

5.1.4 Migrationshintergrund in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall

Bei deutschstämmigen Kindern betrug die Kariesprävalenz 35,9 %, während bei Kindern mit Migrationshintergrund eine signifikant ($p=0,015$) höhere Kariesprävalenz von 50,9 % vorlag (Abbildung 5).

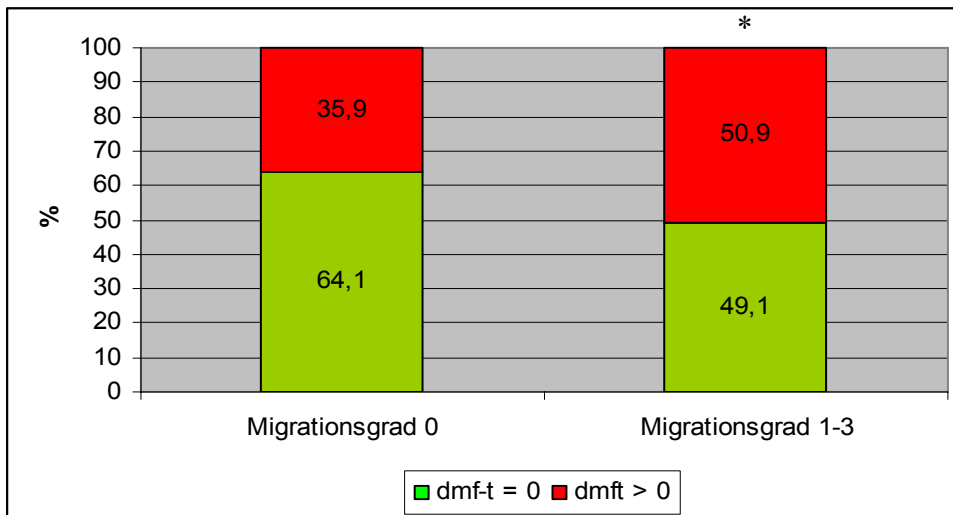


Abbildung 5: Vergleich der Kariesprävalenz zwischen Kindern mit (Migrationsgrad 1-3) und ohne Migrationshintergrund (Migrationsgrad 0) (*: $p \leq 0,05$)

Beim Vergleich der Kinder mit (Migrationsgrad 1-3) und ohne Migrationshintergrund (Migrationsgrad 0) zeichneten sich signifikante Unterschiede der mittleren dt- ($p=0,002$) und dmft-Werte ($p=0,017$) ab. Bei Kindern mit Migrationshintergrund lag ein signifikant höherer Kariesbefall vor als bei deutschstämmigen Kindern. Für die mittleren mt- ($p=0,823$) und ft-Werte ($p=0,337$) waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu beobachten. Abbildung 6 zeigt den Kariesbefall (mittlere dt-, mt-, ft- und dmft-Werte) der beiden Gruppen im Vergleich.

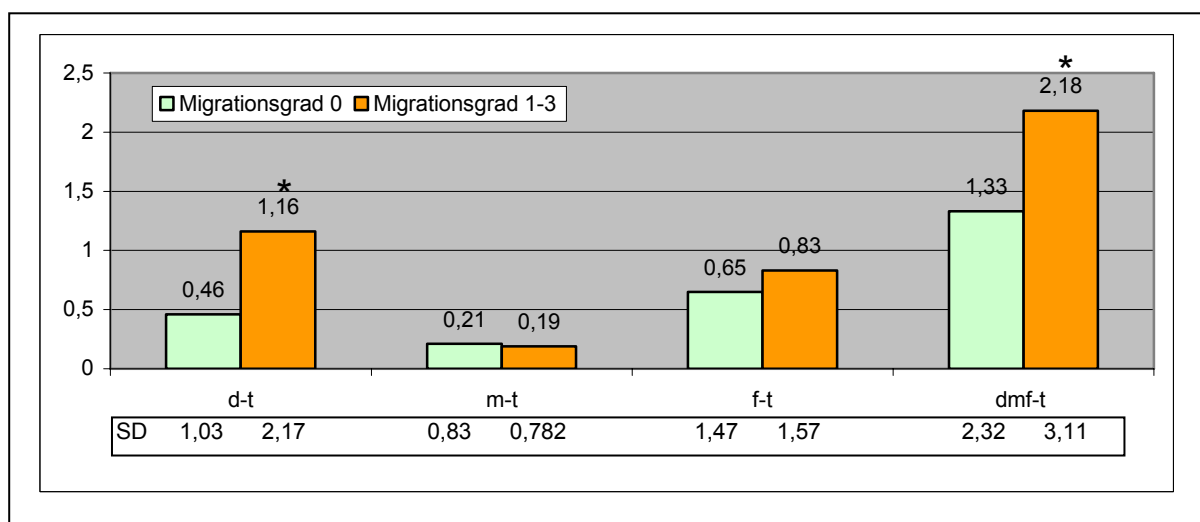


Abbildung 6: Kariesbefall (mittlere dt-, mt-, ft- und dmft-Werte) der Kinder mit (Migrationsgrad 1-3) und ohne Migrationshintergrund (Migrationsgrad 0) (*: $p \leq 0,05$; SD = Standardabweichung)

5.1.5 Beziehung zwischen dem Vorkommen von black stain, Kariesbefall und Migrationshintergrund

Schlussfolgerung aus Kapitel 5.1.2: Kinder mit black stain haben weniger Karies.

Schlussfolgerung aus Kapitel 5.1.3: Kinder mit Migrationshintergrund sind häufiger von black stain betroffen. Diese beiden Aussagen suggerieren zunächst, dass Kinder mit Migrationshintergrund, die häufiger von black stain befallen sind, auch einen geringeren Kariesbefall aufweisen müssten. Entgegen dieser Aussage haben Kinder mit Migrationshintergrund jedoch eine höhere Kariesprävalenz und -erfahrung (Kapitel 5.1.4) als ihre deutschen Altersgefährten. Um die Aussagen der Kapitel 5.1.2 bis 5.1.4 zu verifizieren, erfolgte daher eine Differenzierung des Kariesbefalls nach dem Migrationshintergrund und dem Vorkommen von black stain (Abbildung 7).

Deutschstämmige Kinder (Migrationsgrad 0) mit black stain wiesen einen signifikant ($p=0,003$) niedrigeren Kariesbefall (0,5 dmft) als deutsche Kinder der Kontrollgruppe (1,51 dmft) auf, die nicht von black stain befallen waren. Gleiches galt für die Gruppe der Kinder mit Migrationshintergrund (Migrationsgrad 1-3). Auch hier konnten signifikante ($p=0,003$) Unterschiede im Kariesbefall von Kindern mit black stain (1,17 dmft) und Kontrollkindern ohne black stain (2,82 dmft) festgestellt werden.

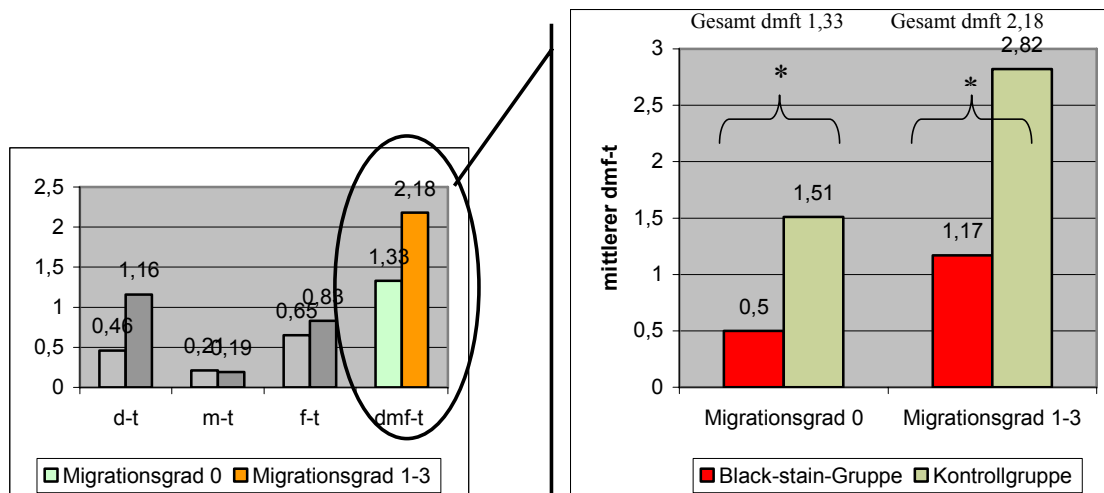


Abbildung 7: Kariesbefall (mittlerer dmft-Wert) bei Kindern mit und ohne Migrationshintergrund in der Black-stain- und in der Kontrollgruppe (*: $p<0,05$)

Insgesamt war der Kariesbefall der Migrantenkinder jedoch signifikant höher, als in der Gruppe der Kinder ohne Migrationshintergrund. Somit konnte die kariesprotektive Wirkung von black stain den höheren Kariesbefall bei Kindern mit Migrationshintergrund nicht vollständig kompensieren. Kinder mit Migrationshintergrund und Black-stain-Befall wiesen mit 1,17 dmft einen signifikant höheren Kariesbefall auf als deutsche Kinder mit black stain (0,5 dmft).

Die Aussage „Kinder mit black stain haben weniger Karies“ muss daher relativiert werden. Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass black stain eine kariesprotektive Wirkung hat (Hypothese 1).

5.2 Qualitative und quantitative mikrobiologische Befunde von Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben

Insgesamt wurden aus 46 Black-stain-Proben der Black-stain-Gruppe und 47 nichtkolorierten Plaqueproben der Kontrollgruppe die Gesamtkeimzahl sowie die kario- und parodontopathogenen Erreger *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Laktobazillen*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeshundii*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* mittels Real-time-PCR quantitativ bestimmt.

Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney auf statistische Signifikanz geprüft.

5.2.1 Gesamtkeimzahl

In allen Proben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden qualitativ Keime nachgewiesen (Abbildung 8).

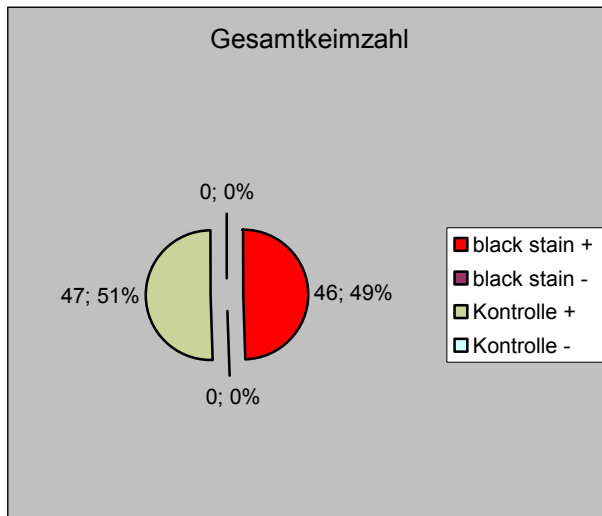


Abbildung 8:

Qualitativer Nachweis der Gesamtkeimzahl (black stain +: Black-stain-Gruppe, Keime nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, keine Keime nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, Keime nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, keine Keime nachweisbar)

Quantitativ wurden mittels Real-time-PCR zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden; die Gesamtkeimzahl war in beiden Gruppen nahezu gleich (Abbildung 9).

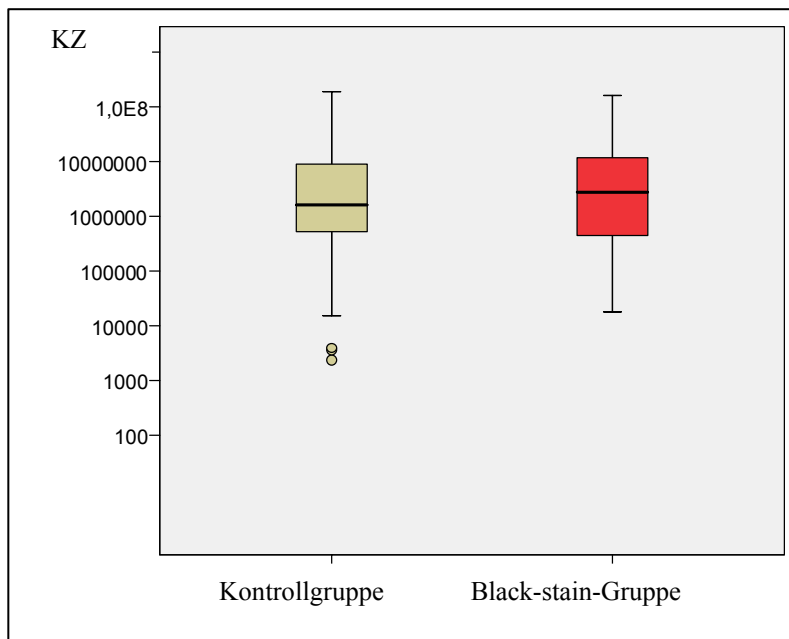


Abbildung 9: Darstellung des quantitativen Nachweises der Gesamtkeimzahl mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, kleinster und größter nachweisbarer Wert, sowie Ausreißerwerte; Ausreißer (°) sind Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen)

5.2.2 Spezies mit signifikanten oder tendenziell signifikanten Unterschieden zwischen Plaqueproben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe

Actinomyces naeslundii

In 96 % der Proben wurde *A. naeslundii* nachgewiesen. In 4 Proben (4 %) von insgesamt 93 (100 %) untersuchten Proben konnte *A. naeslundii* nicht nachgewiesen werden. Alle 4 Proben stammten aus der Kontrollgruppe (Abbildung 10).

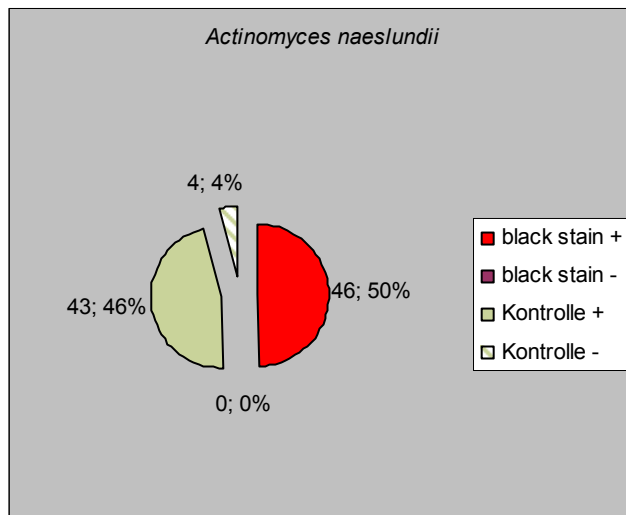


Abbildung 10:

Qualitativer Nachweis von *A. naeslundii*

(black stain +: Black-stain-Gruppe, *A. naeslundii* nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, *A. naeslundii* nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, *A. naeslundii* nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, *A. naeslundii* nicht nachweisbar)

Beim quantitativen Nachweis enthielten die Proben der Black-stain-Gruppe signifikant höhere Keimzahlen ($p=0,002$) von *A. naeslundii* im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 11).

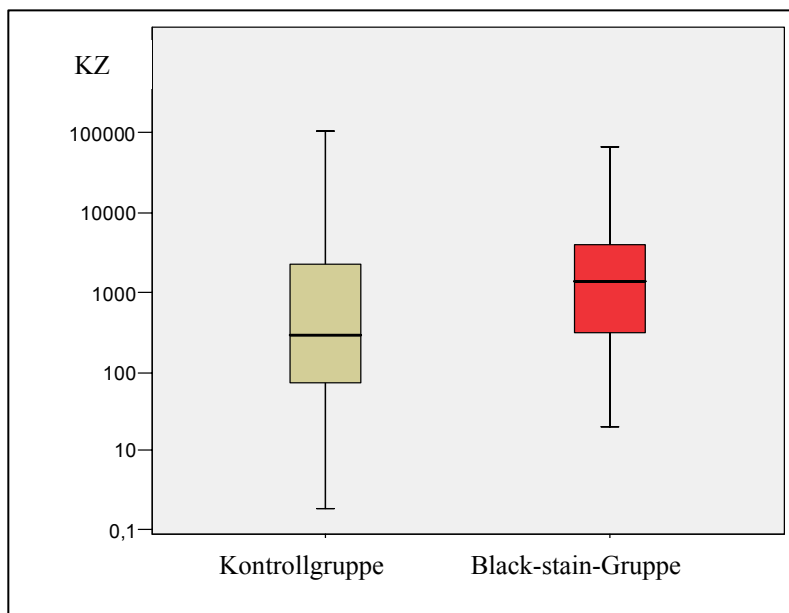


Abbildung 11: Darstellung des quantitativen Nachweises von *A. naeslundii* mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, sowie kleinster und größter nachweisbarer Wert)

Fusobacterium nucleatum

In 94 % der Proben wurde *F. nucleatum* gefunden. Lediglich in 6 (6 %) von insgesamt 93 untersuchten Proben wurde *F. nucleatum* nicht nachgewiesen. Davon entfielen 5 Proben (5 %) auf die Black-stain-Gruppe und 1 Probe (1 %) auf die Kontrollgruppe (Abbildung 12).

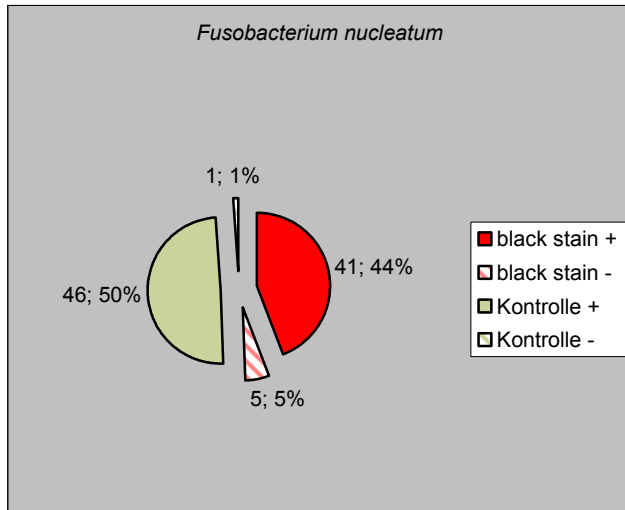


Abbildung 12:

Qualitativer Nachweis von *F. nucleatum*
 (black stain +: Black-stain-Gruppe, *F. nucleatum* nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, *F. nucleatum* nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, *F. nucleatum* nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, *F. nucleatum* nicht nachweisbar)

Beim quantitativen Nachweis von *F. nucleatum* konnten hochsignifikante Unterschiede ($p=0,001$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Dabei lagen in der Black-stain-Gruppe niedrigere Keimzahlen als in der Kontrollgruppe vor (Abbildung 13).

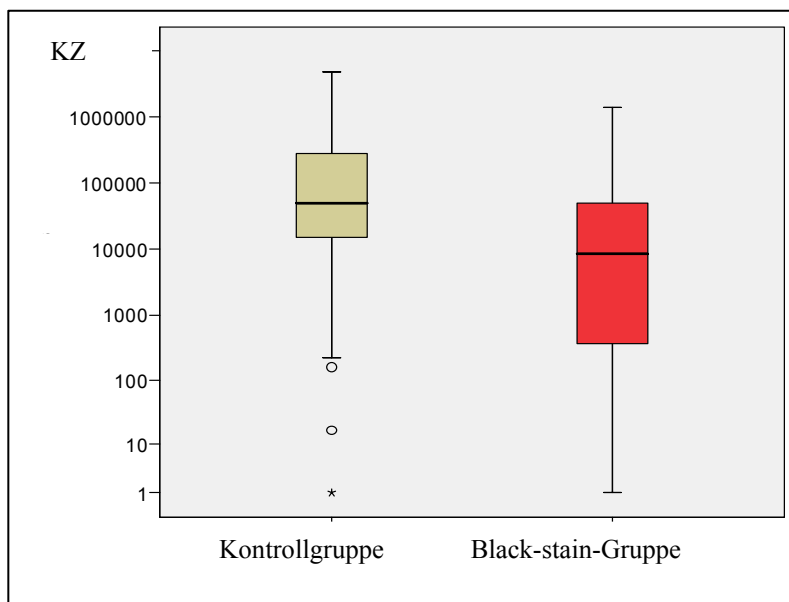


Abbildung 13: Darstellung des quantitativen Nachweises von *F. nucleatum* mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, kleinster und größter nachweisbarer Wert, sowie Ausreißer- und Extremwerte; Ausreißer (°) sind Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen; Extremwerte (*) liegen über drei Boxlängen außerhalb der Box)

Lactobazillen

Der kariogene Keim *Laktobacillus* konnte in 32 Proben der Kontrollgruppe, jedoch nur in 21 Proben der Black-stain-Gruppe nachgewiesen werden. Bei 54 % der Kinder der Black-stain-Gruppe und nur bei 32 % der Kinder der Kontrollgruppe war der Keim nicht vorhanden (Abbildung 14).

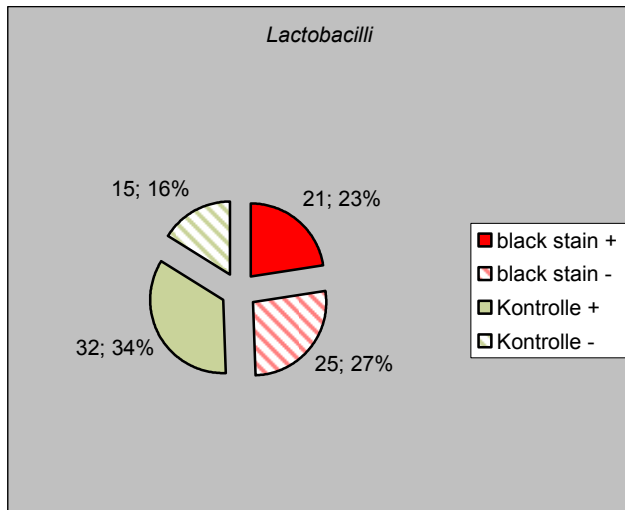


Abbildung 14:

Qualitativer Nachweis von *Lactobazillen*

(black stain +: Black-stain-Gruppe, *Lactobazillen* nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, *Lactobazillen* nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, *Lactobazillen* nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, *Lactobazillen* nicht nachweisbar)

Beim quantitativen Nachweis von *Laktobazillen* wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney hochsignifikante Unterschiede ($p=0,001$) zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Die Kontrollgruppe wies signifikant mehr *Lactobazillen* als die Black-stain-Gruppe auf (Abbildung 15).

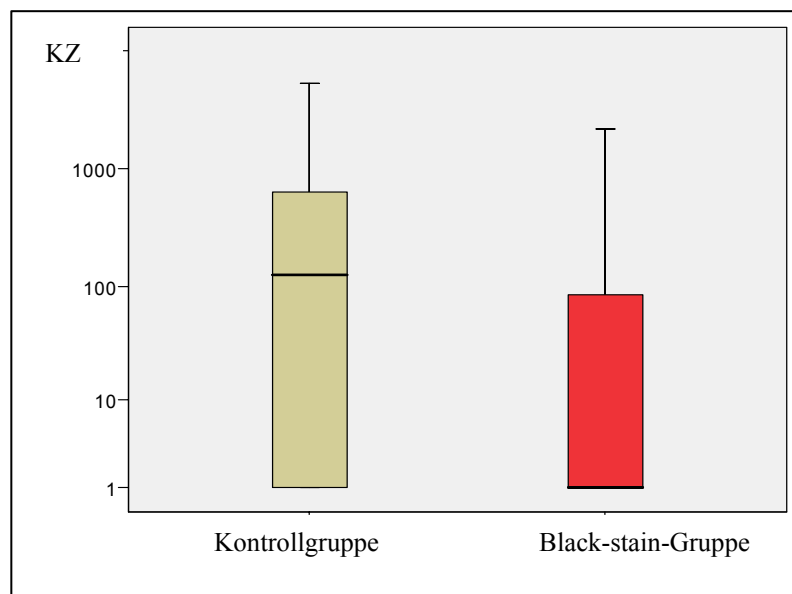


Abbildung 15: Darstellung des quantitativen Nachweises von *Lactobacilli* mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, sowie kleinster und größter nachweisbarer Wert)

Porphyromonas gingivalis

Der parodontopathogene Keim *P. gingivalis* war in 25 (27 %) von insgesamt 93 (100 %) Proben nachweisbar. Davon enthielten 16 (17 %) Black-stain-Proben und nur 9 (10 %) Kontrollproben den Keim (Abbildung 16).

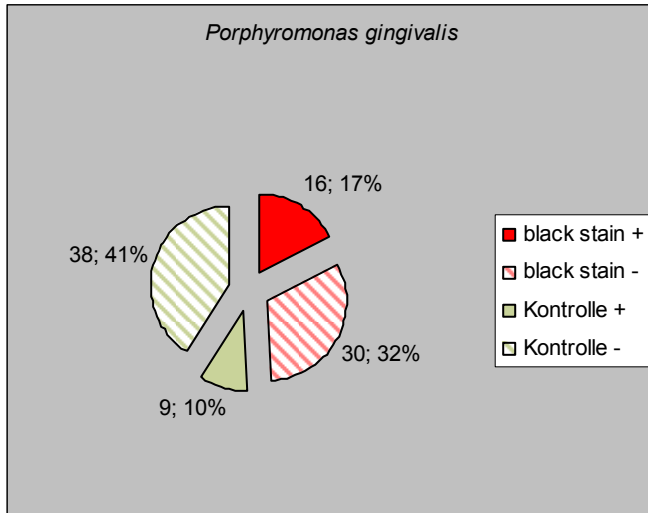


Abbildung 16:

Qualitativer Nachweis von *P. gingivalis*

(black stain +: Black-stain-Gruppe, *P. gingivalis* nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, *P. gingivalis* nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, *P. gingivalis* nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, *P. gingivalis* nicht nachweisbar)

Der quantitative Nachweis mittels Real-time-PCR ergab eine signifikant ($p=0.044$) höhere Anzahl des schwarz pigmentierenden Keimes *P. gingivalis* in der Black-stain-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 17).

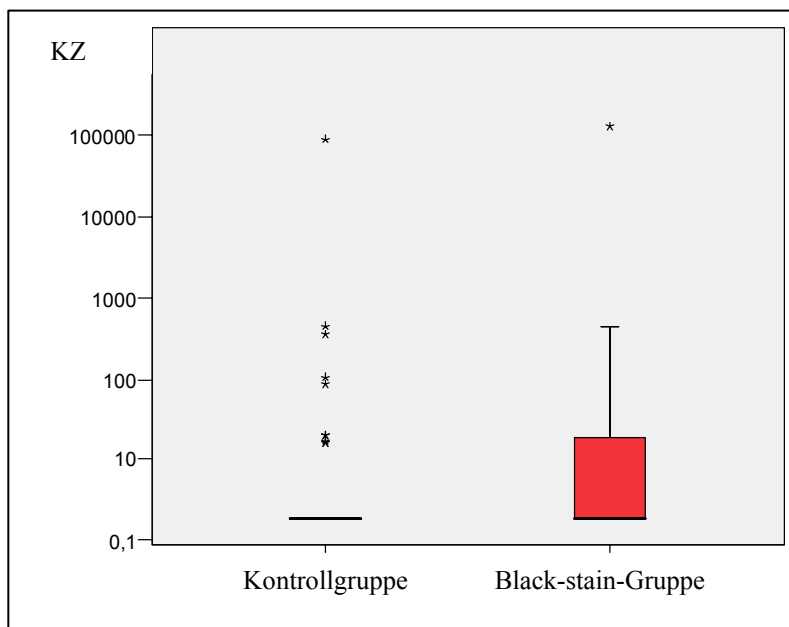


Abbildung 17: Darstellung des quantitativen Nachweises von *P. gingivalis* mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, kleinster und größter nachweisbarer Wert, sowie Ausreißer- und Extremwerte; Ausreißer (°) sind Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen; Extremwerte (*) liegen über drei Boxlängen außerhalb der Box)

Streptococcus mutans

Tendenziell wurde in der Black-stain-Gruppe weniger *S. mutans* nachgewiesen als in der Gruppe ohne black stain. In der Kontrollgruppe wurde in 50 % der Proben ein Keimnachweis geführt, in der Black-stain-Gruppe nur in 38 % (Abbildung 18).

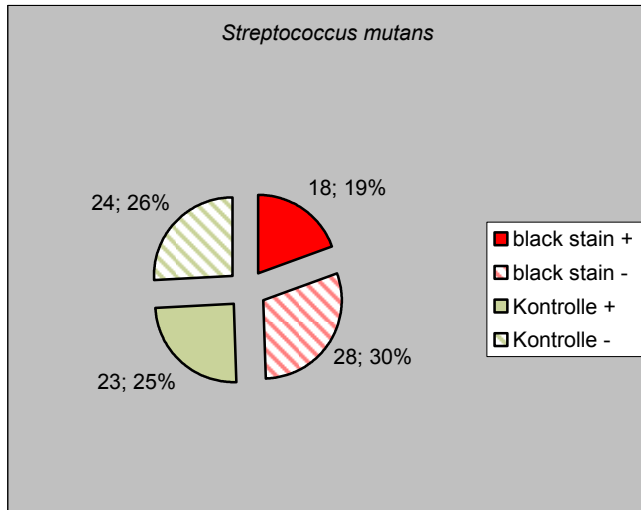


Abbildung 18:

Qualitativer Nachweis von *S. mutans*

(black stain +: Black-stain-Gruppe, *S. mutans* nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, *S. mutans* nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, *S. mutans* nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, *S. mutans* nicht nachweisbar)

Quantitativ ließen sich durch den U-Test nach Mann und Whitney keine signifikanten Unterschiede ermitteln. In der Black-stain-Gruppe lag jedoch eine Tendenz zu einer geringeren Keimbelastung durch *S. mutans* vor (Abbildung 19).

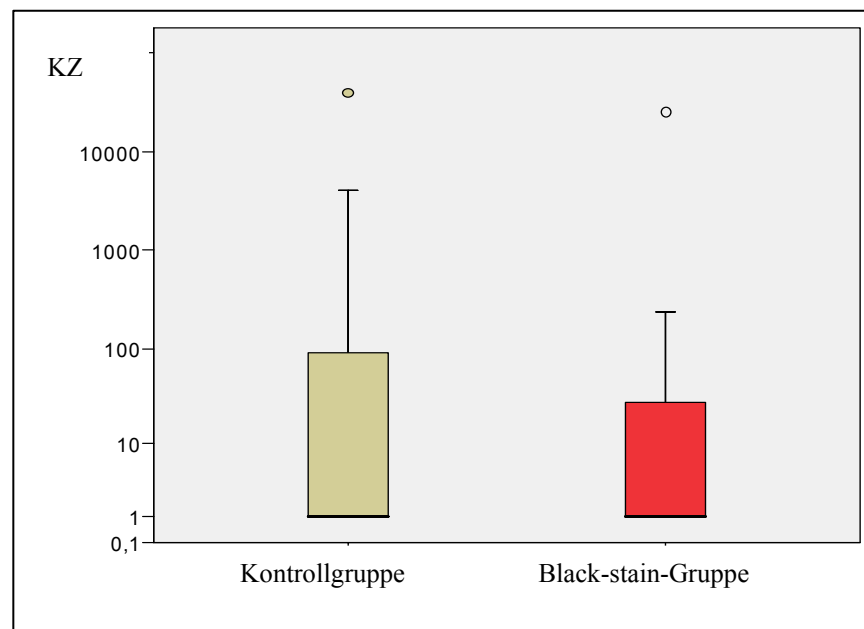
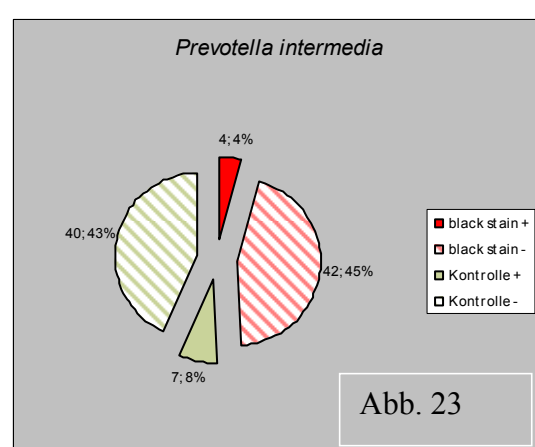
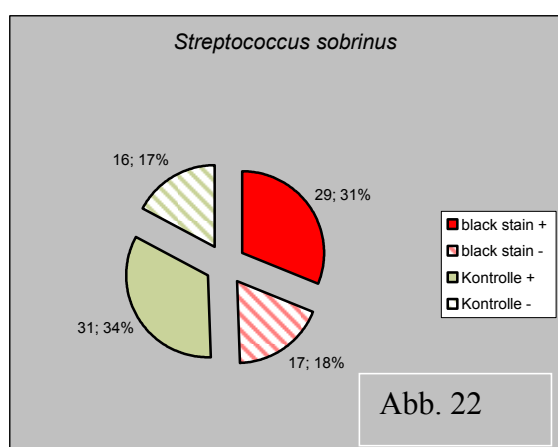
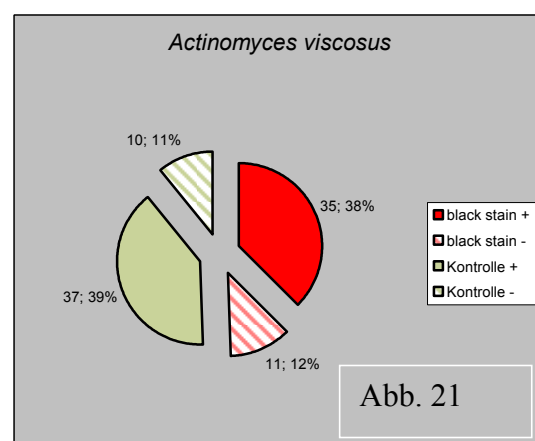
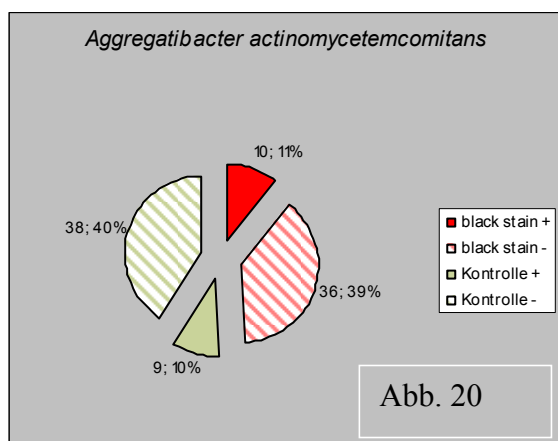


Abbildung 19: Darstellung des quantitativen Nachweises von *S. mutans* mittels Boxplot in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, kleinster und größter nachweisbarer Wert, sowie Ausreißerwerte; Ausreißer (°) sind Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen)

5.2.3 Spezies ohne signifikante Unterschiede zwischen Plaqueproben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe

Sowohl in der Gesamtkeimzahl (Kapitel 5.2.1) als auch bei den Keimen *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *S. sobrinus* und *P. intermedia* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Plaqueproben der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden.

A. actinomycetemcomitans wurde in 21 % der Proben nachgewiesen. Die Verteilung auf die Black-stain-Gruppe und die Kontrollgruppe war nahezu gleich (11 % Black-stain-Gruppe, 10 % Kontrollgruppe). *A. viscosus* wurde in 35 (76 %) von insgesamt 46 Black-stain-Proben und in 37 (78 %) von insgesamt 47 Kontrollproben nachgewiesen. *S. sobrinus* wurde in 65 % aller Proben gefunden, und zwar in 29 Proben der Black-stain-Gruppe und in 31 Proben der Kontrollgruppe. Der parodontopathogene Keim *P. intermedia* konnte nur in 11 Proben nachgewiesen werden (Abbildungen 20-23).



Abbildungen 20-23: Qualitativer Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *S. sobrinus* und *P. intermedia* (black stain +: Black-stain-Gruppe, Keim nachweisbar; black stain -: Black-stain-Gruppe, Keim nicht nachweisbar; Kontrolle +: Kontrollgruppe, Keim nachweisbar; Kontrolle -: Kontrollgruppe, Keim nicht nachweisbar)

Die Auswertungen der quantitativen Nachweise mittels U-Test nach Mann und Whitney ergaben sowohl bei der Gesamtkeimzahl (Kapitel 5.2.1) als auch bei den Keimen *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *P. intermedia* und *S. sobrinus* keine signifikanten Unterschiede (Abbildungen 24-27).

A. actinomycetemcomitans

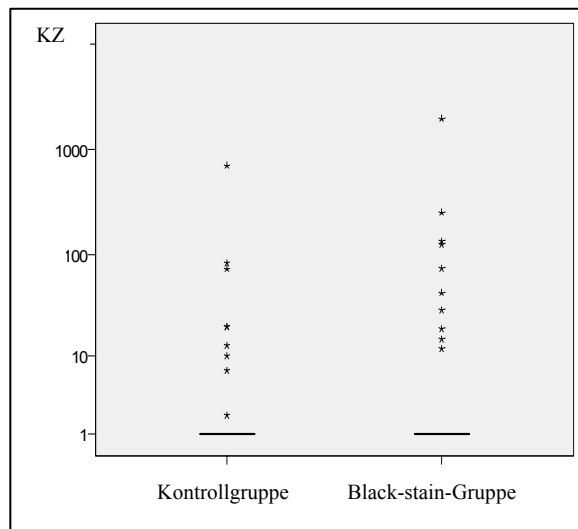


Abbildung 24

A. viscosus

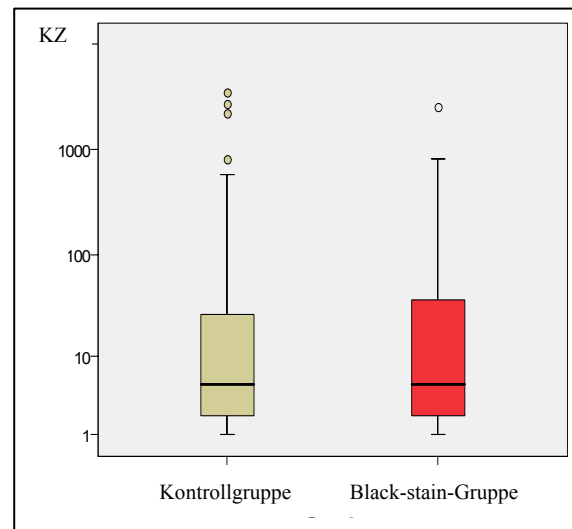


Abbildung 25

P. intermedia

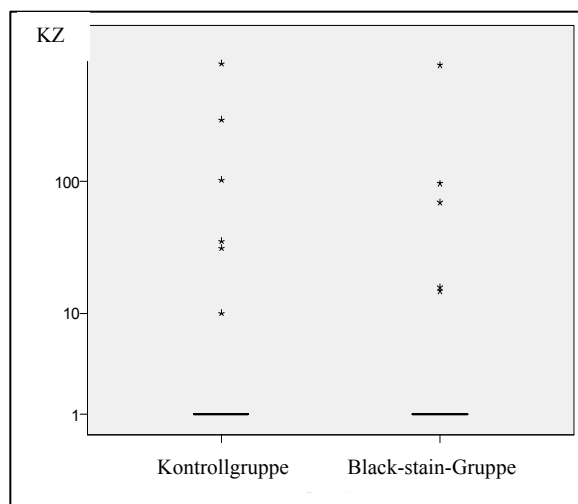


Abbildung 26

S. sobrinus

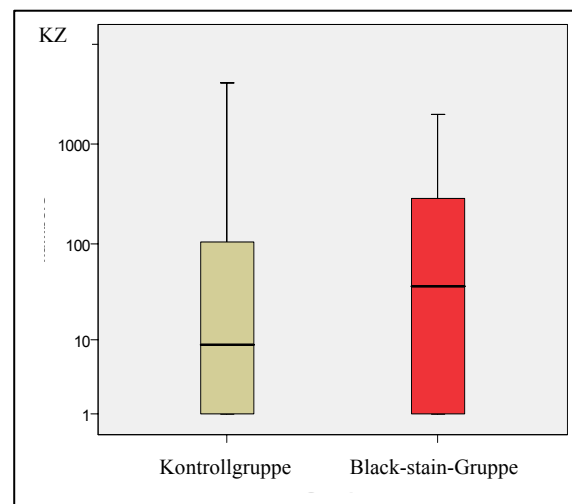


Abbildung 27

Abbildungen 24-27: Darstellung des quantitativen Nachweises von *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *P. intermedia* und *S. sobrinus* mittels Boxplots in der Kontrollgruppe und der Black-stain-Gruppe (Dargestellt sind Median, 25. und 75. Perzentile, kleinster und größter nachweisbarer Wert, sowie Ausreißer- und Extremwerte; Ausreißer (°) sind Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen; Extremwerte (*) liegen über drei Boxlängen außerhalb der Box)

6 DISKUSSION

In manchen kulturellen Kreisen gilt das Schwarzfärben der Zähne als Schönheitssymbol und soll ebenfalls einen kariesprotektiven Effekt haben (Tayanin und Bratthall 2006, Flynn 1977, Balfour 1977). Kammu Frauen in Laos und Vietnam färben ihre Zähne traditionell schwarz. Hierzu benutzen sie Ruß aus verbrannten *Dracontomelon-dao*-Nüssen, *Cratoxylum-formosum*-Holz und *Croton casarilloides*. Dem Ruß aus *Dracontomelon-dao*-Nüssen konnte eine inhibitorische Wirkung auf *S. mutans* nachgewiesen werden (Tayanin und Bratthall 2006). Einige Stämme in Südostasien ätzen ihre Zähne mit Zitronensaft an und tragen dann eine Mixtur aus schwarzer Farbe, Ingwer und Mango auf. An 350 extrahierten schwarzen Zähnen konnten keinerlei Spuren von Karies diagnostiziert werden (Flynn 1977). In Japan tragen ältere Generationen zum „Säubern und Gesunderhalten ihrer Zähne“ eine Mischung aus Eisen, Reiswein und Gall nuts (Balfour 1977) auf und schwärzen so ihr Gebiss. Entgegen dieser Kulturkreise gelten schwarze Zähne in der westlichen Kultur als ästhetisch unschön und ungepflegt. Schwarze Beläge in Form von black stain bedeuten daher eine ästhetische Beeinträchtigung und können bei massivem Befall zu psychosozialen Problemen führen (Garan 2009).

6.1 Diskussion der epidemiologischen Ergebnisse

6.1.1 Prävalenz von black stain

Im Rhein-Kreis Neuss (Dormagen) liegt die Gesamtprävalenz von black stain bei 1,5 %. Kinder im Kindergartenalter zwischen 2 und 6 Jahren wiesen eine Prävalenz von 1,4 % und Kinder im Grundschulalter zwischen 6 und 10 Jahren von 1,5 % auf.

Die in der Literatur beschriebenen Prävalenzraten liegen zum größten Teil höher als die in dieser Untersuchung beobachteten Werte. Bisher wurden Häufigkeiten für black stain zwischen 1,1 und 23,3 % beschrieben (Tabelle 5). Eine Ursache für die niedrige Prävalenz im Rhein-Kreis Neuss, Raum Dormagen, ist aus der Datenlage nicht erkennbar. Auffällig ist jedoch, dass im nahe gelegenen Kreis Heinsberg ebenfalls eine sehr niedrige Prävalenz von 1,1 % beobachtet wurde (Schulwitz 1995). Im Rhein-Neckar-Kreis lag die Häufigkeit von black stain zwar wenig höher bei 4 % (Koch et al. 1996), jedoch im Vergleich zu Angaben in anderen Veröffentlichungen ebenfalls recht niedrig. Kleinere Prävalenzunterschiede lassen sich unter Umständen auf die von den verschiedenen Autoren untersuchten unterschiedlichen Altersgruppen der Kinder zurückführen. Von Commerell (1955) wurde ein Anstieg der Prävalenz bis zum 14. Lebensjahr und von Koch et al. (1996) eine signifikant höhere Prävalenz in den ersten beiden Schulklassen festgestellt. Auch in dieser Studie hatten die

Grundschulkinder mit 1,5 % eine etwas höhere Black-stain-Prävalenz als die Kindergartenkinder (1,4 %). Die in der Literatur angegebenen extrem großen Schwankungen lassen sich jedoch auch unter Berücksichtigung der Altersgruppen nicht erklären. Prävalenzunterschiede könnten auch geografischen Ursprungs sein. Die Untersuchungen wurden in zahlreichen Ländern der Welt, wie der Schweiz (Gülzow 1963, Renz 1973), Italien (Koch et al. 2001), Spanien (Paredes Gallardo und Paredes Cencillo 2005), Brasilien (Gasparetto et al. 2003), auf den Philippinen (Heinrich-Weltzien et al. 2009), in Indien (Shourie 1947) etc., durchgeführt (Tabelle 5). Hier lässt sich die Tendenz erkennen, dass in nicht europäischen Ländern wie Indien, Brasilien und auf den Philippinen eine deutlich höhere Prävalenz von 14-16 % (Shourie 1947, Gasparetto 2003, Heinrich-Weltzien et al. 2009) ermittelt wurde. Auch könnte ein europäisches Nord-Süd-Gefälle vermutet werden. So lag die Black-stain-Prävalenzrate in Polen bei 4,45 % (Surdacka 1987), in Deutschland bei 1,14-4 % (Schulwitz 1995, Koch et al. 1996), in der Schweiz bei 5,4-7 % (Renz 1973), in Italien bei 6,3 % (Koch et al. 2001), in Spanien bei 7,5 % (Paredes Gallardo und Paredes Cencillo 2005) und in der Türkei bei 18,5 % (Garan et al. 2009). Kulturelle Aspekte wie z.B. Ernährungsgewohnheiten oder genetische Dispositionen könnten für die regionale Variabilität des Auftretens von black stain eine Rolle spielen und eventuell Hinweise auf die Ätiologie der schwarzen Beläge geben. In der vorliegenden Studie wurde bei Kindern mit Migrationshintergrund signifikant häufiger Black-stain-Befall diagnostiziert als bei deutschen Kindern. Auf einen kulturellen Einfluss des Auftretens von black stain weist auch eine Studie von *Heinrich-Weltzien et al.* (2009) hin: Auf den Philippinen wurde eine signifikant höhere Black-stain-Prävalenz (45 %) assoziiert mit einer niedrigen Kariesprävalenz und einem geringen Kariesbefall in abgelegenen Gebieten im Vergleich zur Gesamtprävalenz (16 %) in der Studienpopulation ermittelt.

Die hohen Prävalenzwerte von 23,3 % für Deutschland (Fuess 1955) und von 19,9 % für die Schweiz (Gülzow 1963) wurden in neueren Studien nicht bestätigt (Fuchs 2003, Koch 1996, Schulwitz 1995, Renz 1973).

6.1.2 Geschlechtsbezogene Verteilung von black stain

Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Kinder entsprach der demografischen Verteilung (47,4 % männlich und 52,6 % weiblich). Beide Geschlechter waren von black stain zu gleichen Teilen betroffen. In der Black-stain-Gruppe waren 48,7 % der Kinder männlich und 51,3 % weiblich. Der t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,929$) zwischen den Geschlechtern und dem Vorkommen von black stain. Die Autoren *Gülzow* (1963), *Surdacka*

(1987), *Gasparetto* (2003) und *Paredes Gallardo und Paredes Cencillo* (2005) fanden ebenfalls keine geschlechtsbezogenen Unterschiede. *Commerell* (1955) und *Leung* (1950) waren jedoch der Auffassung, dass Jungen häufiger von black stain betroffen sind als Mädchen. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

6.1.3 Vorkommen von black stain in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall

Beim Vergleich der Kariesprävalenz zwischen den Gruppen konnte tendenziell eine niedrigere Kariesprävalenz in der Black-stain-Gruppe (40,7 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (48,5 %) festgestellt werden. Die Kariesprävalenz des befundeten Gesamtkollektivs von 46,5 % wird durch die von *Pieper* (2005) in seinem epidemiologischen Bericht veröffentlichten Daten (Kariesprävalenz für Nordrhein 47,1 %) verifiziert.

Beim Vergleich des Kariesbefalls zwischen der Black-stain-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden Unterschiede im dmft-Wert und in den Einzelkomponenten dt, mt und ft deutlich. Kinder mit black stain wiesen signifikant niedrigere dt-, mt- und dmft-Werte auf als Kinder der Kontrollgruppe. Die Einzelkomponente ft zeigte tendenziell niedrigere Werte in der Black-stain-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der dmft-Wert der Kontrollgruppe (2,01) lässt sich durch die DAJ-Studie von 2004 bestätigen. *Pieper* (2005) konnte hier ebenfalls einen dmft-Wert für 6- bis 7-Jährige in Nordrhein von 2,05 ermitteln.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann die Aussage getroffen werden, dass Kinder mit black stain eine signifikant geringere Karieserfahrung aufweisen als Kinder der Kontrollgruppe. Hypothese 1 dieser Arbeit wurde damit bestätigt. Zahlreiche Autoren (*Pickerill* 1923, *Bibby* 1931, *Pedersen* 1946, *Shourie* 1947, *Fuess* 1955, *Commerell* 1955, *Gülzow* 1963, *Slots* 1974, *Koch et al.* 1996, *Gasparetto* 2003, *Eick et al.* 2006, *Heinrich-Weltzien et al.* 2009, *Leyton et al.* 2009) haben die kariesprotektive Wirkung von black stain ebenfalls beobachtet.

Die Anwesenheit von Black-stain-Belägen bedeutet allerdings nicht, dass eine umfassende Kariesresistenz vorliegt. Black stain wird auch bei Kindern mit starkem Kariesbefall beobachtet. Auch in dieser Studie konnten Kinder mit black stain und einem Kariesbefall bis zu 8 dmft ermittelt werden. Dieses reflektiert deutlich die Tatsache eines multifaktoriellen Kariesgeschehens. Insofern dürfte eine insuffiziente Mundhygiene oder falsche Ernährung die kariesprotektive Wirkung von black stain begrenzen. *Fuchs* (2003) konnte bei Kindern mit black stain aus Förderschulen mit niedrigem sozioökonomischem Status ein erhöhtes Kariesrisiko feststellen. Das würde bedeuten, dass black stain zwar eine kariesprotektive

Wirkung besitzt, jedoch ungünstige kariogene Bedingungen im multifaktoriellen Kariesgeschehen nicht vollständig kompensiert werden. Untersuchungen zur Mundhygiene und zum Ernährungsverhalten von Kindern mit black stain wären notwendig, um diese hypothetischen Vermutungen zu klären.

6.1.4 Vorkommen von black stain in Beziehung zum Migrationshintergrund

In der vorliegenden Untersuchung wiesen Kinder mit Migrationshintergrund signifikant häufiger black stain auf als deutsche Kinder. Die Häufigkeit des Auftretens von black stain nahm mit steigendem Migrationsgrad zu. Hypothese 2 dieser Arbeit wird damit bestätigt. Das Vorhandensein von black stain war positiv mit einer Migrationserfahrung assoziiert.

Auch *Fuchs* (2003) untersuchte die Frage nach dem Zusammenhang von Migrationserfahrung und dem Vorkommen von black stain und konnte ebenfalls eine hochsignifikante Beziehung belegen.

Die regionale Abhängigkeit der Black-stain-Prävalenz wurde bereits diskutiert (6.1.1). Deutsche Kinder wiesen eine deutlich niedrigere Prävalenz von black stain auf als Kinder anderer Länder. Da zwischen dem Vorkommen von black stain und einem Migrationshintergrund ebenfalls eine Beziehung erkannt wurde, wären kulturelle Aspekte, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten oder eine mögliche genetische Disposition, bei der weiteren Ursachenforschung von black stain von Interesse.

6.1.5 Migrationshintergrund in Beziehung zur Kariesprävalenz und zum Kariesbefall

Zahlreiche in den Industrieländern durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass Migranten einen deutlich höheren Kariesbefall aufweisen, einen niedrigeren Sanierungsgrad haben und zahnärztliche Leistungen weniger in Anspruch nehmen als die einheimische Bevölkerung (Butler et al. 2007, Heinrich-Weltzien et al. 2007, van Steenkiste et al. 2004, Fuchs 2003, Schäfer 2000, Lindner et al. 1999, Kühnisch et al. 1998). Diese Beobachtung wurde auch in der vorliegenden Studie bestätigt. Während deutsche Kinder in 64,1 % der Fälle ein kariesfreies (dmft=0) Gebiss hatten, gab es bei Kindern mit Migrationshintergrund signifikant weniger kariesfreie Gebisse (49,1 %). Auch *Schäfer* (2000) beobachtete in Düsseldorf bei Schulneulingsuntersuchungen einen Anteil deutscher kariesfreier Kinder von 77,5 % und bei Kindern nicht deutscher Herkunft von nur 43,6 %. *Fuchs* (2000) fand bei Kindern ohne Migrationserfahrung in 71 % der Fälle Kariesfreiheit, hingegen bei Kindern mit Migrationsgrad 2 in 45 % und mit Migrationsgrad 3 nur in 29,9 % kariesfreie Gebisse.

Weiterhin zeigt der Vergleich der mittleren dt- und dmft-Werte bei Kindern mit und ohne Migrationshintergrund signifikante Unterschiede zugunsten der Kinder deutscher Herkunft. Für die mittleren mt- und ft-Werte wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Die vorliegende Studie bestätigt damit die Beobachtung zahlreicher Autoren (van Steenkiste 2004, Fuchs 2003, Schäfer 2000, Lindner et al. 1999, Önal 1992, Wright und Spencer 1989, Avery 1976), dass die Zahngesundheit von Kindern mit Migrationshintergrund eine schlechte Prognose hat. Die Gründe für diese gesundheitliche Ungleichheit dürften multifaktoriell sein: Das veränderte soziokulturelle Umfeld führt häufig zu schwerwiegenden sozialen Problemen. Einkommen, Bildung, Verständigungsschwierigkeiten, eigene soziale Normen und gesellschaftliche Isolation sind wesentliche zu berücksichtigende Faktoren (Gift et al. 1994, Micheelis und Schiffner 2006). Aus zahnärztlicher Sicht spielt die Ernährung eine besondere Rolle. Oft wird die ursprünglich gewohnte Nahrung nach dem Kulturschock und als Folge des entsprechenden Warenangebots durch eine zahnschädigende, kohlenhydratreiche Ernährung ersetzt. Diese veränderten Essgewohnheiten erfordern jedoch eine entsprechend veränderte Mundhygiene, wie sie in diesem Maße im Ursprungsland häufig nicht bekannt ist. Inwieweit die Zahngesundheit der Migranten durch die veränderte Ernährungsweise beeinträchtigt wird, hängt vom ursprünglichen Lebensumfeld (Dorfbewohner, Stadtbewohner), von den finanziellen Möglichkeiten, vom Bildungsniveau (je höher der Bildungsstand, desto bewusster die Ernährung) und vom Einwanderungsland (ist die vorhandene Infrastruktur dem Herkunftsland ähnlich oder völlig fremd) ab. Weiterhin sind die persönliche Lebenseinstellung, das Alter (jüngere Menschen können sich schneller auf veränderte Lebensumstände einstellen), die Toleranz im Einwanderungsland und der Lebensalltag (geht man einer Beschäftigung nach oder liegt eine Arbeitslosigkeit vor) von Bedeutung (Mashkoori 2004). Es sollten daher spezielle Präventionsprogramme entwickelt werden, die diesen Problemen Rechnung tragen.

Veranstaltungen mit Dolmetscher zum Thema Mundhygiene und Ernährung in Kindergärten und Schulen könnten ein Informationsdefizit in Hinsicht auf die Zahngesundheit in Familien mit Migrationshintergrund verringern. Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Kinderärzten und Zahnärzten ist zwingend erforderlich. Eltern mit Migrationshintergrund wissen, dass man bei Krankheit des Kindes einen Arzt aufsuchen kann. Oft wissen sie jedoch nicht, dass auch Karies ein Erkrankungsbild ist, das zum einen verhindert und zum anderen behandelt werden kann. Die Kinder mit türkisch-kulturellem Hintergrund bilden die größte Migrantengruppe. Die türkische Gemeinschaft ist gut strukturiert und verfügt über zahlreiche Vereine, Organisationen etc., die für eine Kooperation gewonnen werden müssten.

6.1.6 Beziehung zwischen dem Vorkommen von black stain, Kariesbefall und Migrationshintergrund

Schlussfolgerung von Kapitel 5.1.2: Kinder mit black stain haben weniger Karies. Schlussfolgerung von Kapitel 5.1.3: Kinder mit Migrationshintergrund haben häufiger black stain. Diese beiden Aussagen suggerieren zunächst, dass man bei Kindern mit Migrationshintergrund, die häufiger von black stain betroffen sind, auch einen geringeren Kariesbefall beobachten müsste. Entgegen dieser Aussage haben Kinder mit Migrationshintergrund jedoch eine signifikant höhere Kariesprävalenz und -erfahrung (Kapitel 5.1.4) als deutsche Kinder. Um die Aussagen der Kapitel 5.1.2. bis 5.1.4. zu verifizieren, erfolgte daher eine Differenzierung der mittleren dmft-Werte nach Migrationshintergrund und dem Vorkommen von black stain (Abbildung 7). Hierbei wiesen deutschstämmige Kinder mit black stain einen signifikant niedrigeren Kariesbefall auf als deutsche Kinder der Kontrollgruppe ohne Black-stain-Befall. Gleiches galt für die Gruppe der Kinder mit Migrationshintergrund. Auch hier konnten signifikante Unterschiede im Kariesbefall von Kindern mit black stain und Kontrollkindern ohne black stain festgestellt werden. Insgesamt war der Kariesbefall der Migrantenkinder jedoch signifikant höher als in der Gruppe der Kinder ohne Migrationshintergrund. Somit konnte das Vorkommen von black stain den höheren Kariesbefall bei Kindern mit Migrationshintergrund nicht vollständig kompensieren. Diese Tatsache reflektiert deutlich, dass Karies ein multifaktorielles Geschehen ist. Black stain hat bei Kindern mit und ohne Migrationshintergrund zwar eine kariesprotektive Wirkung, kann eine gesundheitliche Ungleichheit, bedingt durch sozioökonomisches Verhalten jedoch nicht ausgleichen. Es sollten spezielle Präventionsprogramme entwickelt werden, die dieses Problem aufgreifen. Dabei muss vor allem auf die Belange von Migrantenfamilien, z.B. durch Vorträge in deren Muttersprache, eingegangen werden. Dies zeigt auch eine Untersuchung von *Greiner et al.* (2009): Sie untersuchten den Einfluss einer zahnärztlichen Beratung von Wöchnerinnen auf die spätere Zahngesundheit des 5-jährigen Kindes und konnten dabei feststellen, dass die Kariesprävalenz und der Kariesbefall von Vorschulkindern mit und ohne Migrationshintergrund durch ihre Präventionsmaßnahme effektiv verbessert werden konnten, dass die Ungleichheit in der Zahngesundheit zwischen beiden Gruppen jedoch nicht vollständig kompensiert wurde. Daher sollten Programme zum Thema Zahngesundheit speziell für Migrantenfamilien erarbeitet werden.

6.2 Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse

Die Untersuchung mittels Real-time-PCR der Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben zeigte für die Black-stain-Gruppe bei gleicher Gesamtkeimzahl eine signifikant höhere Keimbelastung von *A. naeslundii* und *P. gingivalis* sowie hochsignifikant niedrigere Keimzahlen von *F. nucleatum* und *Laktobazillen* im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls konnte eine tendenziell geringere Keimzahl von *S. mutans* in der Black-stain-Gruppe nachgewiesen werden. Keine Signifikanzunterschiede wurden für *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *P. intermedia* und *S. sobrinus* gefunden.

Da die Gesamtkeimzahl für beide Gruppen gleich war (Abbildung 9), muss bei signifikanten Unterschieden in der Keimbelastung der einzelnen Bakterienspezies eine Verschiebung des bakteriellen Spektrums eingetreten sein. Die Hypothese 3 dieser Arbeit, dass sich die bakterielle Zusammensetzung der Black-stain-Proben von der nichtkolorierten Plaque unterscheidet, wird damit bestätigt. Auch die Vermutung von Theilade et al. (1973), dass black stain ein spezieller Typ der dentalen Plaque mit charakteristischer Mikroflora ist, wird mit den mikrobiologischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die Stabilität der mikrobiellen Mundflora, auch als mikrobielle Homöostase bezeichnet, ist Ausdruck einer hohen Dynamik, in dem die relativen Anteile der einzelnen Spezies sich aufgrund zahlreicher sowohl synergistischer als auch antagonistischer Interaktionen in einem bestimmten Gleichgewicht befinden (Marsh 2008). Kommt es zu einer Veränderung einer Schlüsseldeterminanten, z.B. häufiger Verzehr von Zucker oder verminderter Speichelfluss etc., kommt es auch zur Änderung der mikrobiellen Homöostase. Es setzen sich diejenigen Keime durch, die optimal an die veränderten Bedingungen angepasst sind (Marsh 2008). Bei black stain muss also eine veränderte Schlüsseldeterminante vorliegen, damit sich das bakterielle Spektrum ändert und sich ein kariesprotektives Bakterienspektrum etablieren kann. Zur weiteren Aufklärung der Ätiologie von black stain sollten daher Untersuchungen zu habituell kulturellen, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten und Putzverhalten, sowie genetischen Dispositionen folgen.

Synergistische und antagonistische Interaktionen von bakteriellen Spezies sind vielfältig bekannt. So wird beschrieben, dass *Actinomyces* spp. eine antibiotische Wirkung auf *S. mutans* haben, die vergleichbar mit der Wirkung von Oxacillin sein soll (Shin et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechend den Untersuchungen von Shin et al. (2009), neben einem signifikant häufigeren Auftreten von *A. naeslundii* (Abbildung 11), tendenziell geringere Keimzahlen von *S. mutans* (Abbildung 19) in der Black-stain-Gruppe nachgewiesen. Das vermehrte Auftreten von gram-positiven Stäbchen, speziell von

Actinomyzeten in den Black-stain-Proben, wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Slots 1974, Theilade und Pang 1987, Saba et al. 2006, Shin et al. 2009). In der hier vorliegenden Untersuchung wurden die Gattung *Actinomyces* näher spezifiziert. So wurde *A. naeslundii* in den Black-stain-Proben signifikant häufiger nachgewiesen (Abbildung 11), nicht aber *A. viscosus* (Abbildung 25). *A. naeslundii* wird ebenfalls vermehrt nachgewiesen, bei Patienten mit einer guten Mundhygiene, und ruft hier eine stärkere IgG-Reaktion (Actinomyces antibody: A-Ab) hervor. Während Patienten mit einer niedrigen A-Ab-Konzentration eine höhere Karieserfahrung haben, verfügen Patienten mit einer erhöhten A-Ab-Konzentration über einen erhöhten Kariesschutz (Levine et al. 2005). D.h., *A. naeslundii* wirkt kariesprotektiv. Hypothese 4 dieser Arbeit wäre damit bestätigt.

Ebenfalls ist die Bindung von *A. naeslundii* als Pionierkeim am Biofilm abhängig vom Vorkommen und von der Art eines sauren prolinreichen Proteins (aPRP). Die aPRPs bilden einen Hauptbestandteil der Pellikel und werden von den prh1- und prh2-Genen codiert. Diese Gene können verschiedene allele Varianten aufweisen. Eines dieser Allele wird als Db-s-Variante bezeichnet (Azen 1993, Hay et al. 1994). Das Vorkommen der Db-s-Variante korreliert mit einer stärkeren Adhäsion von *S. mutans* und damit einer erhöhten Karieserfahrung. Das Vorkommen von Nicht-Db-s-Typen korreliert mit einer hohen *A. naeslundii*- und niedrigen *S. mutans*-Adhäsion und folglich mit niedriger Karieserfahrung (Stenudd et al. 2001). Genetische Faktoren scheinen hier eine Rolle beim Ansiedeln bestimmter Keime und damit bei der Kariesauslösung zu spielen. Weitere genetische Untersuchungen des Speichelproteins aPRP und seiner allelen Db-s-Varianten könnten Aufschluss über das vermehrte Auftreten von *A. naeslundii* und das verminderte Keimvorkommen von *S. mutans* und die geringere Karieserfahrung bei Kindern mit black stain geben. Eventuell handelt es sich hier um eine Schlüsseldeterminante, die für die Verschiebung des bakteriellen Spektrums bei black stain verantwortlich ist. Ein gehäuftes Auftreten der genetischen Nicht-Db-s-Varianten in den Ländern mit erhöhtem Black-stain-Vorkommen könnte so auch genetisch die Prävalenzunterschiede erklären. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die bakterielle Zusammensetzung von black stain mit erhöhter Keimzahl von *A. naeslundii* und vermindertem Keimvorkommen der kariogenen Keime *S. mutans* und *Lactobacillus* für die geringere Kariesprävalenz bei Black-stain-Trägern verantwortlich ist. Hypothese 4 wird damit bestätigt.

Weiterhin fördern *Actinomyzeten* die Haftung des parodontopathogenen Keimes *P. gingivalis* durch Koaggregation und dessen Wachstum durch ihre freigesetzten Succinate (aus Bernsteinsäure hergeleitete Salze und Ester) (Sanderink 2004). Bei einem vermehrten

Vorkommen von *Aktinomyzeten* sollte man daher auch ein vermehrtes Wachstum von *P. gingivalis* vermuten. In der Black-stain-Gruppe konnten sowohl ein signifikant erhöhter Nachweis von *Aktinomyzeten* als auch eine signifikant höhere Keimzahl von *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Nur in 9 Proben der Kontrollgruppe, aber in 16 Proben der Black-stain-Gruppe wurde der Keim aufgefunden. Auch *Eick et al.* (2006) konnte mittels Real-time-PCR ein signifikant vermehrtes Vorkommen von *P. gingivalis* bei Black-stain-Patienten nachweisen. *P. gingivalis* gehört nicht zur normalen Mundflora und zeigt bei parodontal gesunden Personen eine niedrige Prävalenz. Als sekundärer Besiedler trägt *P. gingivalis* wesentlich zur Auslösung und Progression schwerer Parodontitiden bei (Sixou 2003). Bei den in dieser Studie untersuchten Kindern gab es bisher keine Anzeichen parodontaler Erkrankungen. Auch *Gülzow* (1965) und *Surdacka* (1987) konnten keinen Zusammenhang zwischen entzündlichen Veränderungen des marginalen Parodonts und „schwarzen Zahnbelägen“ bei Kindern nachweisen. Es sollten jedoch Longitudinalstudien folgen, um die Hypothese zu verifizieren, dass die bakterielle Zusammensetzung von black stain zwar eine kariesprotektive Wirkung ausübt, die jedoch im späteren Verlauf mit einer erhöhten Gefahr für parodontale Erkrankungen einhergehen könnte.

Für den Nachweis des parodontopathogenen Keimes *A. actinomycetemcomitans* konnten in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur Untersuchung von *Eick et al.* (2006) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Black-stain-Proben und nichtkolorierten Plaqueproben gefunden werden. Allerdings wurde in der vorliegenden Untersuchung nur in 9 nichtkolorierten Plaque- und in 10 Black-stain-Proben von insgesamt 93 untersuchten Proben der Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* geführt. Hierbei war eine Tendenz zu einem vermehrten Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* in den Black-stain-Proben zu erkennen. Möglicherweise ist die Probandenzahl in der vorliegenden Untersuchung zu gering, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen darzustellen. Weitere Untersuchungen hierzu mit höheren Probandenzahlen und Longitudinalstudien zur Diagnostik parodontaler Erkrankungen bei Black-stain-Trägern wären zur Klärung erforderlich.

P. gingivalis ist ein schwarzpigmentierendes Stäbchenbakterium und kommt in den Black-stain-Proben signifikant häufiger vor als in den nichtkolorierten Plaqueproben. Dass *P. gingivalis* die Ursache für die dunkle Pigmentierung von black stain ist, scheint aber eher unwahrscheinlich. In 64 % der Black-stain-Proben wurde *P. gingivalis* nicht nachgewiesen und kann daher nicht als Ursache für die schwarze Verfärbung in Frage kommen. Das Entstehen der Pigmentation dürfte ein multifaktorielles Geschehen sein, in dem auch *P. gingivalis* eine Rolle spielen könnte.

Nach *Reid et al.* (1977, 1976) sind die Ursachen für die schwarze Verfärbung der schwarzpigmentierende Keim *B. melaninogenicus* (nach neuer Nomenklatur: *P. intermedia*-Gruppe) und Eisensalz, wahrscheinlich Eisensulfid, das durch eine Reaktion von bakteriellem Hydrogensulfid und Eisen aus dem Speichel gebildet wird. *P. intermedia* wurde in der vorliegenden Untersuchung jedoch nur in 4 Black-stain-Proben nachgewiesen und unterschied sich nicht signifikant zu den nichtkolorierten Plaqueproben. Auch *Saba et al.* (2006) konnten kein vermehrtes Auftreten von *P. melaninogenicus* (nach neuer Nomenklatur: *P. intermedia*) in Black-stain-Proben nachweisen.

Auch Eisen konnte in anderen Untersuchungen nicht in größeren Mengen gefunden werden (Surdacka 1987, Putzer et al. 2009). *Putzer et al.* (2009) wiesen eine Eisenkonzentration in black stain von < 100 ppm nach, die zu gering ist, um eine dunkle Verfärbung zu verursachen. Die Bedeutung von Eisen in black stain ist somit bislang nicht geklärt und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die Prävalenz von black stain ist bei Kindern im Rhein-Kreis Neuss (Raum Dormagen, NRW, Deutschland) im Vergleich zu anderen Untersuchungsländern mit 1,5 % sehr niedrig. Die weltweit untersuchten Prävalenzunterschiede von black stain könnten genetischen Ursprung oder habituell kulturelle Hintergründe haben.
2. Black stain hat eine kariesprotektive Wirkung.
3. Black stain ist positiv mit einem Migrationshintergrund assoziiert. Dieses könnte ebenfalls auf einen genetischen Ursprung oder habituell kulturelle Hintergründe deuten. Untersuchungen hierzu müssten diese Hypothese klären.
4. Black-stain-Proben und nichtkolorierte Plaqueproben unterscheiden sich in ihrer bakteriellen Zusammensetzung. Bei gleicher Gesamtkeimzahl findet eine Verschiebung zu einem kariesprotektiven Bakterienspektrum statt.
5. Black stain hat bei Kindern mit und ohne Migrationshintergrund zwar eine kariesprotektive Wirkung, kann eine zahngesundheitliche Ungleichheit, bedingt durch sozioökonomisches Verhalten, jedoch nicht ausgleichen.
6. Die bakterielle Zusammensetzung von Black-stain-Proben mit einer erhöhten Keimzahl von *A. naeslundii* und vermindertem Keimvorkommen von *S. mutans* und *Laktobazillen* dürfte für die geringere Karieserfahrung verantwortlich sein. Die genetische allele nicht-Db-s-Variante des Speichelproteins aPRP korreliert mit hoher *A. naeslundii*- und geringer *S. mutans*-Adhäsion und damit mit einer niedrigen Karieserfahrung. Eventuell handelt es sich hierbei um eine Schlüsseldeterminante, die für die Verschiebung des bakteriellen Spektrums bei Black-stain-Vorkommen verantwortlich ist. Genetische Faktoren scheinen hier eine Rolle bei der Ansiedlung bestimmter Keime und damit bei der Entstehung von Karies zu spielen. Weitere genetische Untersuchungen des Speichelproteins aPRP und seiner allelen Variante Db-s sollten daher folgen.
7. Die Verschiebung des bakteriellen Spektrums mit einer vermehrten Keimzahl parodontopathogener Keime sollte Anlass für Longitudinalstudien sein, um die Hypothese zu prüfen, ob die bakterielle Zusammensetzung von black stain zwar eine kariesprotektive Wirkung hat, die jedoch im späteren Verlauf mit einer erhöhten Gefahr für parodontale Erkrankungen einhergehen könnte.
8. Die Ursache für die schwarze Pigmentation von black stain konnte auch in dieser Studie nicht geklärt werden und gibt Anlass für weitere Untersuchungen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Addy M**, Moran J. 1995. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Adv Dent Res*, 9:450-456.
2. **Adrian J**. 1974. Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. *World Rev Nutr Diet*, 19:71-122.
3. **Ahumada MC**, Colloca ME, Lopez ME, Pesce de Ruiz Holgado A, Nader-Macias ME. 1999. Characterization of lactobacilli isolated from the tongue and gum. *Anaerobe*, 5:129-135.
4. **Amano A**, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S. 1995. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 134:63-67.
5. **Amano A**, Sojar HT, Lee JY, Sharma A, Levine MJ, Genco RJ. 1994. Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 62:3372-3380.
6. **Ashimoto A**, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11:266-273.
7. **Ayers P**. 1939. Green stain. *J Am Dent Assoc*, 26:3-12.
8. **Avery KT**. 1976. The oral health status of migrant and seasonal farmworkers and their families in Florida. *Community Dent Oral Epidemiol*, 4:19-21.
9. **Azen EA**. 1993. Genetics of salivary protein polymorphisms. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4:479-485.
10. **Bailey RW**, Christen AG. 1968. Bleaching of vital teeth stained with endemic dental fluorosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 26: 871-878.

11. **Bakken V**, Jensen HB. 1986. Outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum*. J Gen Microbiol, 132:1069-1078.
12. **Balfour RS**. 1977. Teeth of old Japan. J Am Dent Assoc, 95:1064.
13. **Bartels HA**. 1939. A note on a chromogenic microorganism isolated from an orange colored deposit adhering to teeth. Am J Orthod Oral Surg, 25:795-796.
14. **Bernhardt H**. 1974. Zum Vorkommen der Gattung Lactobacillus im Magen des Menschen. Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig A, 226:479-490.
15. **Bibby BG**. 1931. A study of a pigmented dental plaque. J Dent Res, 11:855-872.
16. **Bioron GmbH**, Kleine Einführung in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Abstract im Internet]. Ludwigshafen: Bioron GmbH.
17. **Bolstad AI**, Jensen HB, Bakken V. 1996. Taxonomy, biology and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev, 9:55-71.
18. **Brook AH**, Smith RN, Lath DJ. 2007. The clinical measurement of tooth colour and stain. Int Dent J, 57:324-330.
19. **Butler J**, Brockstedt M, Uhlig U. 2007. Zahnstatus von Kindern im Berliner Bezirk Mitte nach sozialer Lage und Herkunft. Prophylaxe Impuls, 11:174-187.
20. **Byun R**, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2004. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol, 42:3128-3136.
21. **Carranza FA**, Newman MG. 1996. Dental calculus. In: Carranza FA Jr., Hrsg. Clinical periodontology. 8th Ed. Philadelphia: WB Saunders, 158-159.
22. **Commerell C**. 1955. Zum Problem der Kariesresistenz. Dtsch Zahnärztl Z, 10:1418-1420.

23. **Corbett** 2000. Rotor-Gene 2000 Real Time Amplification Operator's Manual [Handbuch]. Mortlake, Australia: Corbett Research.
24. **Davies** AK, Cundall RB, Dandiker Y, Slifkin MA. 1985. Photo-oxidation of tetracyclin absorbed on hydroxyapatite in relation to the light-induced staining of teeth. *J Dent Res*, 64:936-939.
25. **Dayan** D, Heifferman A, Gorski M, Begleiter A. 1983. Tooth discoloration - extrinsic and intrinsic factors. *Quintessence Int*, 14:195-199.
26. **De Soet** JJ, De Graaff J. 1998. Microbiology of carious lesions. *Dent Update*, 25:319-324.
27. **Dorn** BR, Leung KP, Progulske-Fox A. 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*, 66:6054-6057.
28. **Dreizen** S, Greene H, Carson BC, Spies TD. 1949. The in-vitro-production of a yellowbrown melaninlike pigment in the organic matrix of noncarious human tooth crowns by methylglyoxal and acetol. *J Dent Res*, 28:26-30.
29. **Dzink** JL, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol*, 12:648-659.
30. **Eick** S, Hofmann U, Monse-Schneider B, Heinrich-Weltzien R. 2006. Mikroflora von black stain bei philippinischen Kindern [Kurzvortrag, Poster P7]. 13. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinderzahnheilkunde, Freiburg.
31. **Eick** S, Pfister W. 2002. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 29:638-644.
32. **Eick** S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17:201-208.

33. **Ellingsen** JE, Rolla G, Eriksen HM. 1982. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *J Clin Periodontol*, 9:317-322.
34. **Facklam** RR. 1977. Physiological differentiation of viridans streptococci. *J Clin Microbiol*, 5:184-201.
35. **Faunce** F. 1983. Management of discolored teeth. *Dent Clin North Am*, 27:657-670.
36. **Featherstone** JD. 1994. Fluoride, remineralization and root caries. *Am J Dent*, 7:271-274.
37. **Fitzgerald** RJ, Adams BO, Davis ME. 1994. A microbiological study of recurrent dentinal caries. *Caries Res*, 28:409-415.
38. **Flynn** M. 1977. Black teeth: a primitive method of caries prevention in Southeast Asia. *J Am Dent Assoc*, 95:96-97.
39. **Fouad** AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. 2002. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol*, 40:3223-3231.
40. **Freeman** WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, 26:112-125.
41. **Fuchs** L. 2003. Retrospektive epidemiologische Querschnittsstudie zu statistischen Korrelationen zwischen Kariesprävalenz, Migrationserfahrung, Schultyp und „black stain“ [Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
42. **Fuess** H. 1955. Statistische und bakterielle Untersuchung über den braun-schwarzen Belag [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin.
43. **Garan** A, Adyuz S, Koc Ozturk L, Yarat A. 2009. Some salivary parameters of children with and without black stain [Poster, P18/277]. 22. Kongress der International Association of Paediatric Dentistry in München. *Int J Pediatr Dent*, 19:151-152.

44. **Gasparetto** A, Conrado CA, Maciel SM, Miyamoto EY, Chicarelli M, Zanata RL. 2003. Prevalence of Black Tooth Stains and Dental Caries in Brazilian Schoolchildren. *Braz Dent J*, 14:157-161.
45. **Gift** HC, Corbin SB, Nowjack-Raymer RE. 1994. Public knowledge of prevention of dental disease. *Public Health Rep*, 109:397-404.
46. **Gins** HA, Hrsg. 1949. Einführung in die Bakteriologie (Für Zahnärzte und Studierende der Zahnheilkunde). Zweite Aufl. München: Lehmann.
47. **Goadby** KW, Hrsg. 1903. The mycology of the mouth. London: Longmans, Green & Co.
48. **Greiner** S, Bischof T, Borgert G, Heinrich-Weltzien R. 2009. Effect of health counseling of women in childbed on children`s dental health [Poster, P13/184]. 22. Kongress der International Association of Paediatric Dentistry in München. *Int J Pediatr Dent*, 19:123.
49. **Greve** C. 1953. Farbige Zahnbeläge. *Zahnärztl Prax*, 11:4.
50. **Gülzow** HJ. 1965. Schwarze und grüne Zahnbeläge. Untersuchung über ihre Beziehung zum marginalen Parodontium und zur Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Z*, 20:267-271.
51. **Gülzow** HJ. 1963. Schwarze und grüne Zahnbeläge. Untersuchung über ihre Häufigkeit und über ihre Beziehungen zur Kariesfrequenz. *Dtsch Zahnärztl Z*, 18:1370-1376.
52. **Hattab** FN, Qudeimat MA, al-Rimawi HS. 1999. Dental discoloration: an overview. *J Esthet Dent*, 11:291-310.
53. **Haubek** D, Ennibi OK, Poulson K, Væth M, Poulsen K, Kilian M. 2008. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371:237-242.

54. **Hay** DI, Ahern JM, Schluckebier SK, Schlesinger DH. 1994. Human salivary acidic proline-rich protein polymorphisms and biosynthesis studied by high-performance liquid chromatography. *J Dent Res*, 73:1717-1726.
55. **Heinrich-Weltzien** R, Kühnisch J, Goddon I, Senkel H, Stöber L. 2007. Zahngesundheit deutscher und türkischer Schüler - Ein 10-Jahresvergleich. *Gesundheitswesen*, 69:105-109.
56. **Heinrich-Weltzien** R, Monse B, van Palenstein Helder W. 2009. Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol*, 37:182-187.
57. **Hellwig** E, Klimek J, Attin T, Hrsg. 1995. Einführung in die Zahnerhaltung. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
58. **Herrmann** M. 1965. Veränderung der Zahnfarbe und -struktur bei Morbus hämolyticus neonatorum. *Zahnärztl Welt*, 66:595-602.
59. **Isogai** H, Isogai E, Yoshimura F, Suzuki T, Kagota W, Takano K. 1988. Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Arch Oral Biol*, 33:479-485.
60. **Joiner** A, Muller D, Elofsson UM, Arnebrant T. 2004. Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci*, 112:510-515.
61. **Joiner** A, Muller D, Elofsson UM, Malmsten M, Arnebrant T. 2003. Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci*, 111:417-422.
62. **Kamann** WK, Gängler P. 1999. Der Turner-Zahn. Wenn der Milchzahn Spuren hinterlässt. *Zahnärztl Mitt*, 89:2866-2870.
63. **Kielbassa** AM, Wrbas KT. 2000. Extrinsische und intrinsische Zahnverfärbungen. Teil 1: Ursachen. *Zahnärztl Welt*, 109:177-183.

64. **Kielbassa** AM, Wrbas KT. 2000. Extrinsische und intrinsische Zahnverfärbungen. Teil 2: Therapie extrinsischer Zahnverfärbungen. *Zahnärztl Welt*, 109:246-253.
65. **Klein** H, Palmer CE, Knutson JW. 1938. Studies on dental caries. I. Dental status and dental needs of elementary school children. *Public Health Rep*, 53:751-765.
66. **Kamaguchi** A, Nakayama K, Ohyama T, Watanabe T, Okamoto M, Baba H. 2001. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbiol Immunol*, 44:649-656.
67. **Koch** MJ, Bove M, Niekusch U. 1996. Prävalenz schwarzer Zahnbeläge bei Schulkindern. *Dtsch Zahnärztl Z*, 51:664-665.
68. **Koch** MJ, Bove M, Schroff J, Perlea P, Garcia-Godoy F, Staehle HJ. 2001. Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. *J Dent Child*, 68:353-355.
69. **Kolenbrander** PE, Andersen RN. 1989. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect Immun*, 57:3204-3209.
70. **Kühnisch** J, Heinrich-Weltzien R, Senkel H, Stöber L. 1998. Mundgesundheit und Inanspruchnahme zahnärztlicher Betreuungsleistungen von 8-jährigen Migranten und deutschen Schülern des Ennepe-Ruhr-Kreises. *Gesundheitswesen*, 60:500-504.
71. **Kumagai** Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. 2005. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 73:2655-2664.
72. **Lamont** RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63:3878-3885.
73. **Lancefield** RC. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med*, 57:571-595.

74. **Leimgruber C.** 1950. „Black stain“, Aufbaufaktor und Fluor. Schweiz Monatsschr Zahnheilkd, 60:124-142.
75. **Leung SW.** 1950. Naturally occurring stains on the teeth of children. J Am Dent Assoc, 41:191-197.
76. **Levine M, Owen WL, Avery KT.** 2005. Antibody response to actinomyces antigen and dental caries experience: implications for caries susceptibility. Clin Diagn Lab Immunol, 12:764-769.
77. **Leyton B, Cereceda A, Ormeno A, Bittner M.** 2009. Black stain: microbiological quantification and salivary buffer capacity [Vortrag, 002/13]. 22. Kongress der International Association of Paediatric Dentistry in München. Int J Pediatr Dent, 19:5.
78. **Lindner L, Brunner-Strepp B, Pieper K.** 1999. Kariesprävalenz von deutschen und russischen Kindern. Oralprophylaxe, 21:131-135.
79. **Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B.** 1984. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. Infect Immun, 46:765-772.
80. **Maeda N, Okamoto M, Kondo K, Ishikawa H, Osada R, Tsurumoto A, Jujita H.** 1998. Incidence of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in periodontal health and disease. Microbiol Immunol, 42:583-589.
81. **Marin PD, Bartold PM, Heithersay GS.** 1997. Tooth discoloration by blood: an in vitro histochemical study. Endod Dent Traumatol, 13:132-138.
82. **Marsh PD.** 2008. Das mikrobielle Milieu der Mundhöhle und seine Bedeutung für die orale und die allgemeine Gesundheit. Prophylaxedialog, 2/2007-1/2008:4-7.
83. **Marsh PD, Matrin MV, Hrsg.** 2003. Orale Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

84. **Mashkoori K.** 2004. Migration und der Einfluss auf die Ernährung. In: Migration und öffentlicher Gesundheitsdienst, Landesinstitut für den öffentlichen Gesundheitsdienst des Landes Nordrhein-Westfalen (lögd). Bielefeld: lögd.
85. **Mc Evoy SA.** 1989. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. I. Technique development. Quintessence Int, 20:323-328.
86. **Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM.** 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. Infect Immun, 64:2988-2997.
87. **Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM.** 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun, 59:2719-2726.
88. **Micheelis W und Schiffner U, Hrsg.** 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
89. **Miller WD.** 1894. Untersuchungen über die Zahnbeläge mit besonderer Berücksichtigung der grünen und der metallischen Beläge. Correspondenzbl Zahnärz, 23:193.
90. **Mombelli A, Casagni F, Madianos PN.** 2002. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol, 29:10-21.
91. **Moore WEC, Moore LVH.** 1994. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000, 5:66-77.
92. **Müller HJ, Hrsg.** 2001. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
93. **Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG.** 2002. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res, 81:761-766.

94. **Nathoo** SA. 1997. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. *J Am Dent Assoc*, 128:6-10.
95. **Nishimura** M, Bhuiyan MM, Matsumura S, Shimono T. 1998. Assessment of the caries activity test (Cariostat) based on the infection levels of mutans streptococci and lactobacilli in 2- to 13-year-old children`s dental plaque. *J Dent Child*, 65:248-251.
96. **Nordbö** H, Sorensen R, Sonju T. 1977. Furfurals in chlorhexidine discolored pellicle. *Scand J Dent Res*, 85:606-609.
97. **Önal** B. 1992. Kariesintensität bei türkischen Kindern in Deutschland und in der Türkei. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 102:1333-1336.
98. **Paredes Gallardo** V, Paredes Cencillo C. 2005. Black stain: A common problem in Pediatrics. *An Pediatr (Barc)*, 62:258-260.
99. **Paster** BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183:3770-3783.
100. **Pedersen** PO. 1946. Grundlaget for et cariesprofylaktisk arbejde i dag. *Odontol Tidskr*, 53:379-405.
101. **Petersen** A. 2008. Möglichkeiten und Grenzen mikrobiologischer und molekularer Nachweis- verfahren. *Zahnärztl Mitt*, 98:52-56.
102. **Pickerill** HP. 1923. A sign of immunity. *Brit Dent J*, 2:967-968.
103. **Pieper** K, Hrsg. 2005. Epidemiologische Begleituntersuchung zur Gruppenprophylaxe 2004. Bonn: Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Jugendzahnpflege e.V. (DAJ).

104. **Putzer** P, Felgenhauer FB, Geurtsen W, Bechstein K, Vogt C, Schilke R. 2009. Chemical analysis of black stain on deciduous teeth [Poster]. 87th General Session of the International Association for Dental Research, Miami/USA. J Dent Res, 88 (Spec Iss A), Nr. 779.
105. **Reid** JS, Beeley JA. 1976. Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain. Caries Res, 10:363-369.
106. **Reid** JS, Beeley JA, MacFarlane TW. 1976. A study of the pigment produced by *Bacteroides melaninogenicus*. J Dent Res, 55:1130.
107. **Reid** JS, Beeley JA, McDonald DG. 1977. Investigations into black extrinsic tooth stain. J Dent Res, 56:895-899.
108. **Renz** D. 1973. Etude statistique de la carie dentaire chez les enfants genevois ages de 5 ½ et 6 ½ ans en 1973. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 86:429-447.
109. **Reuter** G. 2001. The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: Composition and succession. Curr Issues Intest Microbiol, 2:43-53.
110. **Rinderer** L. 1967. Verfärbungen und Missbildungen von Zähnen nach Tetracyclin-Medikation im Säuglingsalter. Fortschr Kieferorthop, 28:335-342.
111. **Rolph** HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. 2001. Molecular identification of Microorganisms from Endodontic Infections. J Clin Microbiol, 39:3282-3289.
112. **Ronmark** E, Lundqvist A, Lundback B, Nystrom L. 1999. Non-Responders to a postal questionnaire on respiratory symptoms and diseases. Eur J Epidemiol, 15:293-299.
113. **Russell** W, Bunting DDS, Hrsg. 1929. A Textbook of Oral Pathology. For Students and Practitioners of Dentistry. Philadelphia: Lea and Febiger.

114. **Saba** C, Solidani M, Berlutti F, Vestri A, Ottolenghi L, Polimeni A. 2006. Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic Bacteria. *J Clin Pediatr Dent*, 30:219-224.
115. **Saiki** RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
116. **Saiki** RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
117. **Sakamoto** M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time-PCR. *Microbiol Immunol*, 45:39-44.
118. **Sanderink** RBA, Bernhard H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R, Hrsg. 2004. *Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
119. **Schäfer** M. 2000. Prophylaxe in der Praxis. In: *Karies immer noch ein Problem?*. Symposium Informationskreis Mundhygiene und Ernährungsverhalten (IME). Solingen: IME.
120. **Schmid** H. 1928. *Untersuchung an farbigen Zahnbelägen* [Dissertation]. Basel: Universität Basel.
121. **Schmid** H. 1949. Die Bedeutung des Fluors für die Zähne [Referat]. Eidg. Gesundheitsamt; Quelle aus Leimgruber 1950.
122. **Schröder** HE, Hrsg. 1992. *Orale Strukturbiologie*. Vierte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

123. **Schulwitz R.** 1995. Reihenuntersuchung im Kreis Heinsberg an 6231 Schulkindern zur Charakterisierung eines Zahnbelags, der Mundhygiene und der Ernährung [Dissertation]. Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
124. **Shah HN, Gharbia SE.** 1993. Proposal of a new species *Prevotella nigrescens* sp. nov. among strains previously classified as *P. intermedia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6:97-98.
125. **Sharma A, Somani R.** 2009. Dermatoglyphic interpretation of dental caries and its correlation to salivary bacteria interactions: an in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 27:17-21.
126. **Shay DE, Haddox JH, Richmond JL.** 1955. An inorganic qualitative and quantitative analysis of green stain. *J Am Dent Assoc*, 50:156-160.
127. **Shin JH, Kim MJ, Lee SY, Kim HJ, Kim S.** 2009. The antibiotic activity of *Actinomyces* isolated from black-stained primary teeth to *S. Mutans* [Poster P14/206]. 22. Kongress der International Association of Paediatric Dentistry in München. *Int J Pediatr Dent*, 19:129-130.
128. **Shourie KL.** 1947. Mesenteric line or pigmented plaque: a sign of comparative freedom from caries. *J Am Dent Assoc*, 35: 805-807.
129. **Siqueira JF Jr, Rôças IN.** 2003. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent Res*, 31:333-339.
130. **Sixou M.** 2003. Diagnostik testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis*, 9:54-62.
131. **Slots J, Gibbons RJ.** 1978. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect Immun*, 19:254-264.

132. **Slots J.** 1974. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*, 82:484-490.
133. **Socransky SS, Haffajee AD.** 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38:135-187.
134. **Sönju T, Rölla G.** 1973. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. *Caries Res*, 7:30-38.
135. **Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestal C, Strömberg N.** 2001. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res*, 80:2005-2010.
136. **Suchett-Kaye G, Decoret D, Barsotti O.** 1999. Intra-familial distribution of *Fusobacterium nucleatum* strains in healthy families with optimal plaque control. *J Clin Periodontol*, 26:401-404.
137. **Surdacka A.** 1987. Black stain and caries in children and adolescents in schools. *Czas Stomatol*, 40:763-769.
138. **Surdacka A.** 1989. Chemical composition of the saliva in children and adolescent with black tartar. *Czas Stomatol*, 42:525-533.
139. **Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ.** 1980. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 28:258-268.
140. **Tanner A, Lai CH, Maiden M.** 1992. Characteristics of oral gram-negative species. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St. Louis: Mosby year book, 299-341.
141. **Tayanin GL, Bratthall D.** 2006. Black teeth: beauty or caries prevention? Practice and beliefs of the Kammu people. *Community Dent Oral Epidemiol*, 34:81-86.

142. **Theilade** J, Slots J, Fejerskov O. 1973. The ultrastructure of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*, 81:528-532.
143. **Theilade** J, Pang KM. 1987. Scanning electron microscopy of black stain on human permanent teeth. *Scanning Microsc*, 1:1983-1989.
144. **Trodahl** JN, Schwartz S, Gorlin RJ. 1972. The pigmentation of dental tissues in erythropoietic (congenital) porphyria. *J Oral Pathol*, 1:159-171.
145. **Tsai** CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond BF, Taichman NS. 1979. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun*, 25:427-439.
146. **van Steenkiste** M, Becher A, Banschbach R, Gaa S, Kreckel S, Pocanschi C. 2004. Prävalenz von Karies, Fissurenversiegelungen und Füllungsmaterial bei deutschen Kindern und Kindern von Migranten. *Gesundheitswesen*, 66:754-758.
147. **Vitkov** L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner WD. 2004. Supramolekular pellicle precursors. *Eur J Oral*, 112:320-325.
148. **Vogel** RI. 1975. Intrinsic and extrinsic discoloration of the dentition (a literature review). *J Oral Med*, 30:99-103.
149. **Watts** A, Addy M. 2001. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*, 190:309-316.
150. **Weinberg** A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Prophyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65:313-316.
151. **WHO** 1997, World Health Organization. *Oral Health Surveys Basic Methods*, 4th Edition. Geneva.

152. **Woodall** IR, Dafoe BR, Young NS, Weed-Fonner L, Yankell SL. Polishing the teeth. 1989. In: Comprehensive dental hygiene care. 3rd Ed. St. Louis: CV Mosby: 507-520.
153. **Wright** FAC, Spencer AJ. 1980. Oral studies and service utilization of 5-6 years old children of migrant parents. J Int Assoc Dent Child, 11:13-18.
154. **Xia** T, Baumgartner K. 2003. Occurrence of Actinomyces in infections of endodontic origin. J Endod, 29:549-552.
155. **Yoshida** A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. 2003. Development of a 5' nuclease-based real-time-PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. J Clin Microbiol, 41:4438-4441.
156. **Zambon** JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. 1983. Studies of leukotoxin from actinobacillus actinomycetemcomitans using the promyelocytic HL-60 cell line. Infect Immun, 40:205-212.
157. **Zambon** JJ. 1985. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. J Clin Periodontol, 12:1-20.
158. **Zipper** H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res, 32:103.

9 ANHANG

9.1 Fragebogen zur Erfassung des Migrationshintergrundes und zum Vorliegen von Allgemeinerkrankungen und einer Medikation bei den Probanden

Fragebogen

Anonymisierte Untersuchungsnummer:

Geschlecht: ☐ weiblich
☐ männlich

Geburtsdatum:
Alter:

Schule/Kindergarten:
Klasse/Gruppe:

Geburtsland: ☐ Deutschland
☐ anderes, welches _____
seit wann in Deutschland _____

Geburtsland Mutter: ☐ Deutschland
☐ anderes, welches _____
seit wann in Deutschland _____

Geburtsland Vater: ☐ Deutschland
☐ anderes, welches _____
seit wann in Deutschland _____

Gibt es in Ihrer Familie jemanden, der dieses Phänomen aufweist?

- ☐ nein
☐ ja, wer? _____
☐ weiß nicht

Ist Ihr Kind gesund? ☐ ja
☐ nein
Erkrankung? _____

Nimmt Ihr Kind Medikamente? ☐ nein
☐ ja
Medikament? _____
Dosierung? _____

9.2 Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung



Rhein-Kreis Neuss
Der Landrat

☒ Kreishaus Neuss · 41456 Neuss
☐ Kreishaus Grevenbroich · 41513 Grevenbroich

**Kreishaus Neuss
Kreisgesundheitsamt**

Dormagen,

Amt

Kreisgesundheitsamt
Zahnärztlicher
Gesundheitsdienst -

Gebäude

Kreisgesundheitsamt
Elsa-Brändström Str.19
41540 Dormagen

Auskunft erteilt

Frau Bartsch/Zahnärztin
Frau Kotulla

Telefon

02181-601-5411

Telefax

02181-601-85410

e-mail

birgit.bartsch@rhein-
kreis-neuss.de

Patientenaufklärung zur Untersuchung von schwarzem („black stain“) und nicht-verfärbtem Zahnbelag

Sehr geehrte Eltern,

der zahnärztliche Dienst des Rhein-Kreises Neuss führt in Zusammenarbeit mit der Friedrich-Schiller-Universität Jena eine klinisch-mikrobiologische Untersuchung von schwarzen („black stain“) und nicht-verfärbten Zahnbelägen durch. Im letzten Jahr waren Sie bereits so freundlich, einen Fragebogen zu diesem Problem auszufüllen. Diese Informationen haben uns sehr geholfen. Herzlichen Dank!

In diesem Jahr möchten wir die Untersuchungen erweitern. Aus diesem Grund haben wir Ihnen noch einige Informationen zusammengestellt und möchte Sie bitten, uns weiter zu unterstützen.

Was sind schwarze Zahnbeläge („black stain“)?

Unter „black stain“ versteht man eine 0,5 - 1 mm breite, fest an der Zahnoberfläche anhaftende schwarze Verfärbung.

Die Ursachen der schwarzen Beläge sind bislang wissenschaftlich nicht endgültig geklärt. Die wenigen mikrobiologischen Untersuchungen der schwarzen Beläge lassen die Vermutung zu, dass diese durch weniger kariesaktive Bakterien verursacht werden. In der Regel haben Kinder mit schwarzen Zahnbelägen weniger Karies als Kinder mit nicht-verfärbten Belägen.

Untersuchungsablauf

Um die Frage beantworten zu können, ob andere Bakterienarten in der Mundhöhle von Kindern mit und ohne schwarze Zahnbeläge auftreten, möchten wir etwas Zahnbelag von den Zähnen Ihres Kindes entnehmen, und diese mikrobiologisch im Labor untersuchen. Diese Zahnbelags-Entnahme ist für Ihr Kind selbstverständlich schmerzfrei und birgt keinerlei Risiken.

Vorteile für Ihr Kind

Wenn Sie es wünschen, wird Ihr Kind gern zahnärztlich untersucht. Es wird eine *kostenfreie* professionelle Zahnreinigung und eine präventive Lokalapplikation eines Fluoridlackes durchgeführt.

Datenschutz

Die Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich freiwillig. Die Daten werden anonym und nur zu wissenschaftlichen Zwecken ausgewertet.

Kontakt

In den nächsten Tagen würde ich versuchen, Sie telefonisch zu erreichen. Falls Sie und Ihr Kind sich für eine Mitarbeit entschließen, würde ich Sie gern in unser Gesundheitsamt einladen und einen Termin mit Ihnen vereinbaren. Über eine Zusammenarbeit würde ich mich natürlich sehr freuen.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen selbstverständlich zur Verfügung. Da wir täglich zu den Reihenuntersuchungen in Schulen und Kindergärten unterwegs sind, erreichen Sie uns am besten

Montag – Freitag
zwischen 7.30-8.30 und 11.30-12.30
Tel.-Nr.: 0 21 81-601-5411.

Wir möchten uns bei Ihnen und Ihrem Kind ganz herzlich bedanken.

Es grüßt Sie freundlich,

Ihre Schulzahnärztin
i.A. Birgit Bartsch

Patientenaufklärung

Der Vater/Die Mutter des/der Patienten/in wurde von mir über Art und Zweck der klinisch-mikrobiologischen Untersuchung von schwarzem („black stain“) und nicht-verfärbtem Zahnbelag unterrichtet.

Eine schriftliche Patientenaufklärung wurde den Eltern des/der Patienten/in zugeschickt.

Datum

Birgit Bartsch (Zahnärztin)

Einwilligungserklärung

Ich stimme der Teilnahme meines Kindes _____
an der Untersuchung von schwarzem („black stain“) und nicht-verfärbtem Zahnbelag zu.

Datum

Unterschrift Erziehungsberechtigte/ Patient(in)/

9.3 Vorträge und Veröffentlichungen

Bartsch B, Eick S, Heinrich-Weltzien R. 2009. Black stain: A PCR microbiological study of cariogenic and periodontopathogenic micoroflora [P14/214]. 22. Kongress der International Association of Paediatric Dentistry in München, 17-20 Juni 2009. Int J Pediatr Dent, 19:132.

In Vorbereitung:

Bartsch B, Heinrich-Weltzien R. 2010. Mundgesundheit von Kindern mit und ohne Black-stain-Befall in Beziehung zum Migrationshintergrund. Oralprophylaxe.

Bartsch B, Eick S, Heinrich-Weltzien R. 2010. Microflora of childen with and without black stain. Eur J Paediatr Dent.

9.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere Frau Prof. Dr. R. Heinrich-Weltzien, Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde und Kinderzahnheilkunde am Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Jena für die jederzeit freundliche, kompetente und unkomplizierte wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen Anregungen beim Verfassen dieser Arbeit und der Veröffentlichung der Daten auf dem Kongress der IAPD in München.

Großer Dank gilt auch Frau PD Dr. S. Eick, Klinik für Parodontologie der Universität Bern für die große Unterstützung bei mikrobiologischen Fragen und für die Einarbeitung in die PCR-Diagnostik. Auch der medizinisch technischen Assistenten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Frau Claudia Ranke möchte ich herzlichen Dank sagen für die große Hilfe bei der Durchführung der PCR.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern für ihre langjährige und immer fortwährende Unterstützung.

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname
Geburtsdatum
Geburtsort
Staatsangehörigkeit
Familienstand
Schulabschluss
Berufe

Bartsch, Birgit
19.04.1965
Grevenbroich
Deutsch
Ledig
Allgemeine Hochschulreife
Zahnärztin
Med.- techn. Laboratoriumsassistentin
Arzthelferin

Schulbildung

1971 – 1975
1975 – 1981

Evgl. Grundschule, Grevenbroich
Städt. Realschule, Grevenbroich

Schul. Weiterbildung

1991 – 1993

Abendgymnasium der VHS Düsseldorf
Abschluss: Fachhochschulreife

1994

Prüfung für den Hochschulzugang von besonders befähigten
Berufstätigen (Begabtenabitur)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1981 – 1982

Ausbildung zur **Arzthelferin**
Praxis Dr. Grill (Internist), Grevenbroich
Vorzeitiger Abschluss: Arzthelferin-Brief

1983 – 1985

Weiterbildung zur **MTLA** an der staatl. anerkannten Lehranstalt für techn.
Assistenten in der Medizin,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abschluss: Med.- techn. Assistentin

Berufstätigkeit

1982 – 1983

Arzthelferin bei Dr. Grill (Internist), Grevenbroich

1985 – 1996

Angestellte als MTLA
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Med. Mikrobiologie und Virologie

Studium

1995 – 2000

Studium der Zahnmedizin
Naturwissenschaftliche Vorprüfung 10.10.1996
Zahnärztliche Vorprüfung 06.10.1997
Zahnärztliche Prüfung 06.11.2000

Tätigkeitsumfeld als Zahnärztin

01.03.2001 – 30.09.2001	Gemeinschaftspraxis Dr. G. Schütz, Dr. A. Moll Bergheim
01.10.2001 – 30.10.2002	Gemeinschaftspraxis Dr. L. Beckers, Dr. G. Dohmen Heinsberg
seit 01.04.2006	Zahnärztliche Praxismgemeinschaft „Die plus-Zahnärzte“ Kinderabteilung Düsseldorf
seit 01.11.2002	Gesundheitsamt, Rhein-Kreis-Neuss

Weiterbildung

11.04.2005 – 09.08.2007	Weiterbildung zur Fachzahnärztin für öffentliches Gesundheitswesen an der Akademie für Öffentliches Gesundheitswesen Düsseldorf <i>Abschluß: Fachzahnärztin für öffentliches Gesundheitswesen</i>
01.01.2006 – 11.05.2007	Curriculum Kinderzahnheilkunde, Akademie Praxis Wissenschaft, APW München <i>Abschluß: Tätigkeitsschwerpunkt Kinder- und Jugendzahnheilkunde</i>

Grevenbroich, 15.04.2010

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Frau Prof. Dr. Roswitha Heinrich-Weltzien, Frau PD Dr. Sigrun Eick,

die Hilfe eines Promotionsberater nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Grevenbroich, 15.04.2010